

THESE

Présentée par

Clothilde Bertin

Née le 11 Mars 1983 à Bergerac (Dordogne)

Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LYON I

Discipline : microbiologie

Ecole Doctorale : E2M2

Etude de la synthèse des exopolysaccharides sécrétés par les mycoplasmes du groupe «mycoides» et, notamment, par *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, agent de la péripneumonie contagieuse bovine.

Présentée et soutenue publiquement :

Le 20 Mars 2014

Membres du jury

M. BOIRON P.,	Professeur à l'UCB de Lyon I.....	Président du jury
M. BLANCHARD A.,	Professeur à l'INRA-Bordeaux 2 de Villenave d'Ornon.....	Rapporteur
M. NEYROLLES O.,	Professeur au CNRS-Université Paul Sabatier de Toulouse.....	Rapporteur
Mme COURTOIS J.,	Professeur à l'IUT-Université Jules Verne d'Amiens.....	Examineur
M. POUMARAT F.,	Directeur de recherches à l'ANSES de Lyon.....	Directeur de thèse
M. THIAUCOURT F.,	Chercheur au CIRAD de Montpellier.....	Directeur de thèse

THESE

Présentée par

Clothilde Bertin

Née le 11 Mars 1983 à Bergerac (Dordogne)

Pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LYON I

Discipline : microbiologie

Ecole Doctorale : E2M2

Etude de la synthèse des exopolysaccharides sécrétés par les mycoplasmes du groupe «mycoides» et, notamment, par *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, agent de la péripneumonie contagieuse bovine.

Présentée et soutenue publiquement :

Le 20 Mars 2014

Membres du jury

M. BOIRON P.,	Professeur à l'UCB de Lyon I.....	Président du jury
M. BLANCHARD A.,	Professeur à l'INRA-Bordeaux 2 de Villenave d'Ornon.....	Rapporteur
M. NEYROLLES O.,	Professeur au CNRS-Université Paul Sabatier de Toulouse.....	Rapporteur
Mme COURTOIS J.,	Professeur à l'IUT-Université Jules Verne d'Amiens.....	Examineur
M. POUMARAT F.,	Directeur de recherches à l'ANSES de Lyon.....	Directeur de thèse
M. THIAUCOURT F.,	Chercheur au CIRAD de Montpellier.....	Directeur de thèse

Laboratoires d'accueil

Cette thèse a été réalisée dans [l'UMR Mycoplasmoses des Ruminants](#)

A l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)

31, avenue Tony Garnier

69394 Lyon Cedex 07

France

Et dans [l'UMR Contrôle des Maladies Animales, Exotiques et Emergentes](#) (CMAEE)

Au Centre International de Recherche en Agronomie pour le Développement (CIRAD)

TA A-15 / G

Campus international de Baillarguet

34398 Montpellier Cedex

France

Sous la direction de François Poumarat et de François Thiaucourt

Et l'encadrement de Patrice Gaurivaud et de Lucia Manso-Silvan

LES MEMBRES DU JURY

Prof. Alain BLANCHARD, INRA-Université Victor Segalen Bordeaux 2, UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, 71 av. E. Bourlaux. B.P. 81, 33 883 Villenave d'Ornon Cedex, France, Tél.: + 33(0) 5 57 12 23 93, E-mail: alain.blanchard@bordeaux.inra.fr

Prof. Patrick BOIRON, ISPB – Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon I UMR 5557 - Ecologie Microbienne, Pavillon Georges Nétien, 19 rue Nungesser et Coli, 69 008 Lyon, Tél.: +33(0) 4 78 77 70 20, E-mail: patrick.boiron@univ-lyon1.fr

Prof. Josiane COURTOIS, Université de Picardie Jules Verne, EA 3900-BioPI Biologie des Plantes et Innovation, IUT d'Amiens, Département Génie Biologique, Avenue des Facultés, Le Bailly et Faculté de Pharmacie, 1, rue des Louvels, 80 025 Amiens cedex, France, Tél.: +33(0) 3 22 53 40 92, E-mail : josiane.courtois@u-picardie.fr

Prof. Olivier NEYROLLES, Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, UMR 5089 CNRS-Université Paul Sabatier, Mécanismes Moléculaire des Infections à Mycobactéries, 205 route de Narbonne, 31 077 Toulouse, France, Tél.: +33(0) 5 61 17 54 75, E-mail: olivier.neyrolles@ipbs.fr

Dr François POUMARAT, ANSES Laboratoire de Lyon - VetAgro Sup-Campus vétérinaire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des ruminants, 31 avenue Tony Garnier, 69 364 Lyon Cedex 07, France, Tél. : +33(0) 4 78 72 65 43, E-mail : francois.poumarat@anses.fr

Dr François THIAUCOURT, CIRAD - INRA UMR 15, Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes, TA A-15/G, Campus international de Baillarguet, 34 398 Montpellier Cedex 5, France, Tél.: +33(0) 4 67 59 37 23, E-mail: francois.thiaucourt@cirad.fr

Etude De La Synthèse Des Exopolysaccharides Secrétés Par Les Mycoplasmes Du Groupe «mycoides» Et Notamment Par *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, Agent De La Péripleumonie Contagieuse Bovine

RESUME

Notre modèle d'étude, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*), est l'agent de la péripleumonie contagieuse bovine (PPCB). Cette maladie fut un des plus grands fléaux de l'élevage bovin au XIXème siècle et sévit encore largement en Afrique. A cause de son impact sur l'économie, elle a bénéficié de grandes attentions dans les pays industrialisés, notamment lors des épisodes de résurgence européens dans les années 1980-90. Inscrite sur les listes de l'OIE, la PPCB est à déclaration obligatoire, ce qui entraîne de sévères mesures de restriction sur le commerce des animaux vivants. Plusieurs espèces de mycoplasmes sont phylogénétiquement proches de *Mmm*. Pour mieux comprendre la pathogénie de cette maladie, il est nécessaire d'analyser les facteurs qui peuvent concourir à la virulence de l'agent pathogène incriminé.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux exopolysaccharides (EPS) de *Mmm*, candidats clés dans la virulence de cette bactérie. Ils ont été caractérisés chimiquement par HPLC et RMN, puis comparés aux polysaccharides capsulaires (CPS) dans le cadre d'une étude sur des variants intraclonaux de *Mmm*. Ces expériences ont été rendues possibles grâce à l'élaboration d'un protocole offrant une production optimale des EPS pour les analyses et un affranchissement des contaminants du milieu lors de leur isolement à partir des surnageants de culture. Ce protocole a permis, par ailleurs, d'élargir l'étude de caractérisation chimique des EPS au groupe « mycoides » auquel appartient *Mmm*. La production d'anticorps monoclonaux anti-polysaccharides a offert la possibilité d'étudier les communautés antigéniques au sein du groupe et de caractériser la localisation du polymère sécrété (CPS et/ou EPS). Les génomes séquencés et annotés disponibles ont fait l'objet d'études *in silico* sur les voies de biosynthèse potentiellement impliquées dans la production des polysaccharides.

Les résultats montrent que dans le cas de *Mmm*, les variants d'un même clone présentent des différences de production de polysaccharides se traduisant par un phénotype opaque/translucide en culture sur milieu solide pouvant être associé à un « switch ON/OFF » du gène qui code un transporteur de glucose. *Mmm* sécrète du galactane (polymère de β -D-(1-6) galactofuranose) identique au composé associé à la membrane. Au sein du groupe « mycoides », deux espèces sécrètent un β -D-(1-2) glucane dont la structure linéaire est originale. L'analyse des voies de biosynthèse des génomes concernés concorde avec les deux produits mis en évidence. De nombreux gènes impliqués semblent résulter de transferts latéraux venant de mycoplasmes éloignés phylogénétiquement mais qui partagent le même habitat.

Mots clés : mycoplasmes, groupe «mycoides», exopolysaccharides, variation, caractérisation

Study Of Secreted Exopolysaccharides Synthesis By Mycoplasmas From The Mycoplasma mycoides Cluster And Notably By *Mycoplasma mycoides* Subsp. *mycoides*, The Contagious Bovine Pleuropneumonia Agent.

SUMMARY

Our model, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*), is the agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). CBPP is a severe contagious disease currently present in Africa. CBPP is classed as a notifiable disease by the OIE, which implies severe restrictive measures in the trade of live animals. Because of its economic importance, CBPP has received much attention in industrialized country, notably when the disease had re-emerged in Europe in 1980's and 90's. To better understand the pathogenesis of this disease, it is necessary to analyze the factors that may contribute to the virulence of this agent.

In this context, we were interested in *Mmm* exopolysaccharides (EPS), potential key molecules in the virulence of this bacterium. First, *Mmm* EPS were chemically characterized by HPLC and NMR and compared to the capsular polysaccharides (CPS) in a study on intracolonial *Mmm* variants. To conduct these experiments, a suitable methodology was developed to produce and to purify EPS from culture supernatants by avoiding technical difficulties due to the complexity of the mycoplasma growth medium. Then, this protocol allowed extending the study to the chemical characterization of EPS from mycoplasmas belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster (MMC) as *Mmm*. The production of monoclonal antibodies recognizing *Mmm* and *Mccp* polysaccharides was used to study the antigenic communities within this group of mycoplasmas and to characterize the location of the secreted polymer (CPS and/or EPS). The sequenced and annotated genomes were used to manage *in silico* studies of biosynthetic pathways potentially involved in the production of polysaccharides.

The results showed that *Mmm* intracolonial variants resulting in an opaque / translucent phenotype on solid culture may be associated with an "ON/OFF switch" of the gene encoding a glucose transporter and, in turn associated to the production of either CPS or EPS. *Mmm* secretes a β -(1-6) galactofuranose polymer identical to that of the membrane associated compound, excepted it has no lipid anchor. Within MMC, there are two species that secrete a β -(1-2) glucan, the linear structure of which is original. The analyses of the biosynthetic pathways of the different genomes were consistent with the structure of the related secreted products. Many genes could appear to originate from phylogenetically distant mycoplasmas that share the same habitat.

Keywords : mycoplasma, *Mycoplasma mycoides* cluster, exopolysaccharides, variation, characterization

A mon grand-père

Remerciements

Je remercie Didier Calavas, Dominique Martinez et Thierry LeFrançois de m'avoir accueillie dans les laboratoires de l'ANSES et du CIRAD.

Je remercie toute l'équipe myco de l'ANSES ! François, merci pour vos conseils, votre écoute et votre confiance. Patrice, merci énormément pour tes conseils, ton aide précieuse sur tous les fronts. Tu es un super encadrant ! Florence T. merci pour ton soutien, ton honnêteté, ta droiture et, cela va sans dire, pour la relecture de ce manuscrit. Merci Agnès P., Véronique et Agnès T. pour votre aide au labo et nos discussions sur les occupations du week-end. Merci Dominique pour ta gentillesse et je suis ravie d'avoir rencontré Polly Pocket, fais-lui une caresse de ma part ! Un merci aussi au duo de la laverie et également à tout le labo!

Je remercie au même titre toute l'équipe bactério du CIRAD ainsi que l'UMR 15 au complet ! François, merci pour ton aide, ta générosité, d'avoir été présent au moment le plus critique et surtout de m'avoir permis de me constituer un stock de blagues pour quelques temps ! Je ne dirai qu'une chose, « vive les tétons de jeunes filles » (cf les colonies de mycoplasmes)! Lucia, Virginie merci pour votre aide précieuse, vos conseils, votre écoute et votre gentillesse.

Je tiens à remercier MM Alain Blanchard et Olivier Neyrolles qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce manuscrit de thèse. Je remercie également Mme Josiane Courtois et Mr Patrick Boiron d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

Josiane, un remerciement particulier pour l'accueil au sein de votre laboratoire. Merci à vous, ainsi que Corinne, j'ai appris beaucoup à vos côtés et, fait non négligeable, j'ai visité la superbe ville qu'est Amiens ! Merci Josiane pour vos nombreuses questions qui m'ont poussée à me creuser la tête et prendre du recul. Merci Corinne pour ton aide, ta patience et ta gentillesse.

Charlotte, merci pour ton soutien moral, tes coups de pieds aux fesses pendant les pauses café, les soirées et les fous rires. Toi-même tu sais, « ça claque sa c..... ! » Merci également à Sarah et Natacha mes supers colloqs de bureau à l'ANSES pour votre bonne humeur. Un super merci à la team CMAEE ! De supers rencontres, j'y ai même trouvé des amis. Vous êtes tellement nombreux, ne m'en veuillez pas si j'oublie quelqu'un ! Juliana, Marlène, Stéphanie et Jennifer même bureau ou presque, même

galère, ça c'est sûr ! Courage pour la suite ! Ce fût un plaisir de ramer à vos côtés les filles ☺ Un gros merci également à Matthieu pour avoir partagé avec moi de grands moments de centrifugations acétonées, je te dis « merci Patrick *_* ! ». Jonathan, les Ewoks te souhaitent bonne chance pour ta nouvelle route, que la photographie de douze soit avec toi ! Juliette ma sauveuse, la fée pour organiser les sous-vêtements dans les cartons et donner des cours de mise en page ! I love you Baby ! Habib, un gros poutou à toi mon "p'tit chou.", ton rire qui met de bonne humeur restera à jamais gravé dans mes oreilles ! Du courage à toi aussi, tu tiens le bon bout comme on dit ! Ignace, je t'aurais bien laissé mon canapé mais j'en avais besoin ! Ramzi, reste éloigné des sources de cryptonite et tout ira bien ! Xavier, tu ne viens plus aux soirées, que se passe-t-il ? Gwen prépare moi une place, j'arrive ! Merci Isa pour ces litres de milieu et ces pots de centri, toujours prêts dans les temps, tu es la fée du labo ! Denise, Nadège, Vêrane et Safia A.C, sans vous, je serais perdue dans les limbes administratives ! Des pensées et des merci aussi à re-Virginie, re-Lucia, Karine, Dominique (qui devrait arrêter de fumer désormais ;-), Manu (le pro du déplacement de machine à laver sans efforts), Adeline, J.B, Alexis, Laetitia, Marina, Tania, Sergio, Oliver Stone, Anissou, Simon, Carine, Armelle, les Philippe, Valérie, Géraldine, Patricia, Nicolas, Olivier, Renata, Claire, Thomas et tous les autres ! Trop de gens sympathiques rencontrés, merci à vous, que ce soit pour les éclats de rire pendant les repas mais aussi les oreilles attentives et les conseils.

Je remercie également mes amis et ceux qui ont apporté leur petit brin de sel pendant ces trois années ! Lily & Richi, Georges, Fifille, Raksha et Le Gen, J.D, Jean-Pierre dixit « soir et matin, le train c'est plus malin ! », Stéphanouche et Francky, Bêran & Rémi, Beethoven, Cicy, Cédric (je t'envoie la facture pour t'avoir mis dans la liste :-p), Laure (maître un jour, maître toujours !), Cicé, Chopin, Framboise, Piopio, Gilles & Val, Khalil, Quentinou, le déménageur breton, le vieux Jean, Mathilde, Keul, la caféine et tous les autres...

Merci à ma famille. Je remercie mes grands-parents et mon père qui m'ont toujours soutenue et respecté mes choix de vie. Je remercie également ma mère, qui me demande au moins deux fois par an de lui écrire ce que je fais sur un bout de papier ☺

Je remercie mon mari. Lio, même si tu fais parfois partie de la catégorie « de ceux qui osent tout », je t'aime ! Merci d'être là.

TABLE DES MATIERES

ABBREVIATIONS	17
LISTE DES PUBLICATIONS	19
LISTE DES COMMUNICATIONS	20
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	21
LISTE DES FIGURES	21
LISTE DES TABLEAUX.....	24
CONTEXTE SCIENTIFIQUE	25
CHAPITRE I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	28
I. La classe des Mollicutes et le groupe «mycoïdes»	29
I.1. La classe des Mollicutes	29
I.1.1. Caractéristiques majeures de la classe des Mollicutes	29
I.1.2. Classification	31
I.1.2.1. Phylogénie	32
I.1.2.2. Taxonomie	35
I.1.3. Les Mollicutes, des génomes petits mais complexes	36
I.2. Le groupe « mycoïdes »	38
I.2.1. Présentation du groupe « mycoïdes ».....	38
I.2.1.1. Identification et classification.....	38
I.2.1.2. Les maladies ou syndromes induits par les membres du groupe «mycoïdes».....	42
I.2.2. Pathogénicité des membres du groupe « <i>mycoïdes</i> »	46
I.2.2.1. La sécrétion d'H ₂ O ₂	46
I.2.2.2. Les lipoprotéines.....	48
I.2.2.3. Les variations antigéniques	49
I.2.2.4. Les polysaccharides	50
II. Les polysaccharides bactériens et leur biosynthèse	51
II.1. Les polysaccharides bactériens.....	51
II.1.1. Composition.....	51
II.1.2. Classification selon la composition chimique.....	53
II.1.2.1. Les homopolysaccharides	53
II.1.2.2. Les hétéropolysaccharides :	53
II.1.3. Classification selon la localisation	54
II.1.3.1. Polysaccharides structuraux ou pariétaux.....	55
II.1.3.2. Polysaccharides capsulaires.....	57
II.1.3.3. Les exopolysaccharides.....	58

II.2.	Les polysaccharides en tant que facteurs de virulence	58
II.3.	Biosynthèse des polysaccharides.....	59
II.3.1.	Transport des sucres.....	59
II.3.2.	Modifications enzymatiques et activation du monosaccharide importé	60
II.3.3.	Polymérisation	61
II.3.4.	L'export du polymère	62
III.	Les polysaccharides de mycoplasmes	64
III.1.	Généralités	64
III.2.	Les polysaccharides découverts chez les mycoplasmes du groupe « <i>mycoides</i> ».....	65
III.2.1.	Le galactane de <i>Mmm</i>	65
III.2.1.1.	Découverte et caractérisation	65
III.2.1.2.	Implication du galactane dans la virulence de <i>Mmm</i>	67
III.2.2.	Les polysaccharides des autres membres du groupe « <i>mycoides</i> ».....	67
III.2.3.	Les polysaccharides du groupe « <i>mycoides</i> » dans le diagnostic.....	68
IV.	Objectifs de recherche	69
CHAPITRE II ETUDE DES EXOPOLYSACCHARIDES SECRETES PAR <i>MYCOPLASMA MYCOIDES</i> SUBSP. <i>MYCOIDES</i>		72
I.	Résumé.....	73
II.	Article-1 : Caractérisation des exopolysaccharides libres sécrétés par <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	74
III.	Résultats complémentaires.....	84
III.1.	Introduction.....	84
III.2.	Matériel et Méthodes	84
III.2.1.	Souches, mutants et conditions de culture	84
III.2.2.	Préparation des échantillons	84
III.2.3.	Production des anticorps monoclonaux	85
III.2.4.	Sélection des clones d'hybridomes positifs et analyse des mutants de la banque.....	85
III.3.	Résultats :	86
III.3.1.	Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre le galactane de <i>Mmm</i>	86
III.3.2.	Recherche de mutants déficients dans la production de galactane	86
IV.	Points de conclusion du chapitre II	88
CHAPITRE III ETUDE DES POLYSACCHARIDES SECRETES DES MYCOPLASMES MEMBRES DU GROUPE « MYCOIDES »		90
I.	Résumé.....	91
II.	Article 2 (version provisoire)	92
II.1.	Abstract.....	93

II.2.	Introduction	94
II.3.	Materials and methods.....	97
II.3.1.	Mycoplasma strains and culture conditions.....	97
II.3.2.	EPS production and extraction	98
II.3.3.	Monosaccharide composition	98
II.3.4.	NMR spectroscopy.....	99
II.3.5.	Monoclonal antibodies production	99
II.3.6.	SDS-PAGE and western blotting	100
II.3.7.	Agar gel immunodiffusion test (AGID)	100
II.3.8.	In silico analyses	100
II.4.	Results.....	102
II.4.1.	Presence of EPS in extracts.....	102
II.4.2.	Chemical characterization of EPS from Mycoplasma mycoides cluster by HPAEC and NMR.....	102
II.4.3.	Generation of monoclonal antibodies against EPS of Mmm and Mccp	105
II.4.4.	Immunological comparisons.....	105
II.4.5.	<i>In silico</i> analysis of EPS biosynthetic pathways in the MMC.....	107
III.	DISCUSSION	112
III.1.	EPS composition	112
III.2.	<i>In silico</i> analysis of EPS biosynthetic pathways in the MMC.....	113
IV.	Conclusions and perspectives:	115
V.	Points de conclusion du chapitre III	117
	CHAPITRE IV CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES.....	118
I.	Conclusions générales.....	119
II.	Perspectives	122
	ANNEXES	126
	BIBLIOGRAPHIE	140

ABBREVIATIONS

A, C, T, G, U	Adénine, Cytosine, Thymine, Guanine, Uracile
ADN	Acide Déoxyribo <u>n</u> ucléique
ADNr	ADN ribosomique
ARN	Acide Ribo <u>n</u> ucléique
CDS	Séquence Cod <u>a</u> nte (Coding Sequence)
CPS	Polys <u>a</u> ccarides Capsulaires (Capsular Polys <u>a</u> ccarides)
COG	Cluster de Groupes Orthologues (Cluster of Orthologous Groups)
ELISA	Dosage d'immuno-absorption par enzyme liée (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EPS	Exopo <u>l</u> ys <u>a</u> ccaride
GT	Glycosyl <u>t</u> ransférase
HGT	Transfert Horizontal de Gènes (Horizontal Gene Transfert)
HPLC	Chomatographie en phase liquide haute performance
IC	Inhibition de Croissance
IS	Séquence d'Insertion
kDa	kilo Dalton
LPG	Lipoglycane
LPS	Lipopolysaccharide
Mab	Anticorps Monoclonaux (Monoclonal Antibodies)
Mpb	Méga paires de bases
Mmm	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>
Mmc	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i>
Mcc	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>
Mccp	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>
M. leachii	<i>Mycoplasma leachii</i>
MLST	Typage de Séquence en Multi <u>l</u> ocus (Multi <u>l</u> ocus Sequence Typing)
NDP	Nucléoside DiPhosphate

NTP	Nucléoside TriPhosphate
OP	O <u>p</u> aque
PAS	Acide Périodique Schiff (Periodic Acid Schiff)
PBS	Tampon Phosphate Salin (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Poly <u>e</u> thylène Glycol
PPCB	Péripneumonie Contagieuse Bovine
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase (Polymerase Chain Reaction)
PPCC	Pleuropneumonie Contagieuse Caprine
PPLO	Pleuropneumonia like Organism
PTS	Phospho <u>t</u> ransférase
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
SDS-PAGE	Electrophorèse en conditions dénaturantes (Sodium Dodécyl-Sulfate – Poly <u>a</u> crylamide Gel Electrophoresis)
TR	T <u>r</u> anslucide (Translucent)

LISTE DES PUBLICATIONS

BERTIN C., PAU-ROBLOT C., COURTOIS J., MANSO-SILVAN L., TARDY F., POUMARAT F. DEJEAN M., GAURIVAUD P., THIAUCOURT F.

Characterization of the secreted polysaccharides of the *Mycoplasma mycoides* cluster and their possible metabolic pathways.

Version provisoire, soumission prévue dans Applied and Environmental Microbiology

BERTIN C., PAU-ROBLOT C., COURTOIS J., MANSO-SILVAN L., THIAUCOURT F., TARDY F., LEGRAND D., POUMARAT F., GAURIVAUD P.,

Characterization of Free Exopolysaccharides Secreted by *Mycoplasma mycoides* Subsp. *mycoides*.

PLoS One. 2013 Jul 15; 8(7):e68373. doi: 10.1371/journal.pone.0068373.

LISTE DES COMMUNICATIONS

Travaux de thèse :

BERTIN C.*, GAURIVAUD P., THIAUCOURT F., LEGRAND D., MANSO-SILVAN L., PAU-ROBLOT C., COURTOIS J., POUMARAT F. (2013) Study of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* exopolysaccharides. 5th Congress of European Microbiologists (FEMS) 2013. Leipzig, Germany. July 21-25th (Poster).

BERTIN C., PAU-ROBLOT C., COURTOIS J., MANSO-SILVAN L., THIAUCOURT F., TARDY F., LEGRAND D., POUMARAT F., GAURIVAUD P.* (2013) Characterization of free exopolysaccharides secreted by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. European Mycoplasma Meeting 2013. Dubrovnik, Croatia. June 6-7th (Communication Orale).

BERTIN C.*, GAURIVAUD P., THIAUCOURT F., LEGRAND D., MANSO-SILVAN L., PAU-ROBLOT C., COURTOIS J., POUMARAT F. (2012). New insights into *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* Small Colony secreted exopolysaccharides. Microbiologists day of INRA (JMI) 2012. L'Isle-sur-la-Sorgue, France. November 13-15th (Poster).

BERTIN, C.*, GAURIVAUD P., THIAUCOURT F., LEGRAND D., MANSO-SILVAN L., PAU-ROBLOT C., COURTOIS J., POUMARAT F. (2012). Etude des exopolysaccharides sécrétés de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony. Journée des doctorants et post-doctorants de l'Anses (JDD 2012). Maisons-Alfort, France. October 22th (Communication orale)

Travaux de master :

GUEGUENIAT J., BOUVERY N., **BERTIN C.**, DOULIEZ J.P., BATAILLER B., RENAUDIN J., BEVEN L.* (2012). Lipid-lipoprotein interactions in the membrane of *Spiroplasma citri*. 19th International Congress of International Organization for Mycoplasmaology (IOM). Toulouse, France. July 15-20 th (Communication orale)

BERTIN C., BRETON M., YAO T., DUBRANA M.-P., DURET S., BATAILLER B., RENAUDIN J., BÉVEN L.* (2010). Proteomics of detergent (Triton X-100) resistant membranes (DRMs) of *Spiroplasma citri* reveal a structural function for spiralin. 18th International Congress of international Organization for Mycoplasmaology. Chianciano Terme, Italy. July 11-16 th (Poster).

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

Figure I.1 : Section ultrafine de cellules mycoplasmaïques observées en microscopie électronique.	30
Figure I.2 : Observation de colonies de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> cultivées en milieu gélosé.	31
Figure I.3 : Arbre de vie.	33
Figure I.4 : Arbre phylogénétique de la classe des Mollicutes basé sur les séquences d'ADNr 16s et établi selon l'estimation du maximum de vraisemblances.	34
Figure I.5 : Arbre phylogénétique du groupe « mycoides » réalisé par la méthode du plus proche voisin avec les séquences concaténées de cinq gènes de ménage	41
Figure I.6 : Représentation schématisée des potentiels mécanismes de virulence de Mmm	47
Figure I.7 : Schématisation du mécanisme de variation du gène MSC_0860 codant la Pts-G	50
Figure I.8 : Exemple du glucose. (A) Les énantiomères D- et L-glucopyranose. (B) Les formes de cyclisation et d'anomères avec les α et β glucofuranose ou glucopyranose	52
Figure I.9 : Schématisation de l'architecture de surface d'une bactérie à Gram négatif.	54
Figure I.10 : Représentation schématisée de l'organisation de la membrane d'une bactérie à Gram positif.	56
Figure I.11 : Représentation schématisée de l'organisation de la membrane d'une bactérie à Gram négatif.	56
Figure I.12 : Schématisation des réactions enzymatiques d'activation du glucose en nucléoside sucre (A) et exemple de modification enzymatique de l'UDP-Glucose par épimérisation (B).	61
Figure I.13 : Schématisation de la réaction enzymatique d'une glycosyltransférase.	62
Figure I.14 : Modèles des processus impliqués dans l'export des polysaccharides	63
Figure I.15 : Structure moléculaire d'un disaccharide de galactofuranose liés en β -(1-6), constituant du galactane.	66
Figure I.16 : Observation par microscopie électronique d'une section de mycoplasmes isolés d'un filament de culture et immergés dans un antisérum x 14 700.	66

Chapitre II

Figure II.1: Exopolysaccharide (EPS) secretion by <i>Mmm</i> strain Afadé' in supplemented PPLO broth and CMRL-1066 medium.	77
Figure II.2: Kinetics of exopolysaccharides secretion and viability of <i>Mmm</i> strain Afadé' following transfer into CMRL-1066 medium with (red) or without (blue) glucose supplementation.	78
Figure II.3: NMR spectra of EPS produced by <i>Mmm</i> . A: ^1H NMR spectrum, B: 2D COSY NMR spectrum and C: 2D HSQC NMR spectrum.....	80
Figure II.4: PG1T colony opacity is related to the presence of capsular material.	81
Figure II.5: Growth, pH and exopolysaccharide (EPS) secretion of translucent (blue) and opaque (red) colony variants in CMRL- 1066 medium.	81
Figure II.6: Variation in <i>Mmm</i> colony opacity associated to antigenic variation of the glucose PTS permease.....	82
Figure II.7 : Le Mab 2.1.31 reconnaît le galactane de <i>Mmm</i> souche Afadé.	86
Figure II.8 : Schéma récapitulatif de la voie de biosynthèse du galactane selon que le phénotype sur agar soit opaque (à gauche) ou translucide à droite).....	89

Chapitre III

Figure III.1: ^1H NMR spectra of EPS produced by <i>Mmm</i> Afafé (A), <i>Mmm</i> 8740 (B), <i>Mccp</i> 95043 (C) and <i>M. leachii</i> PG50 (D).	103
Figure III.2: 2D COSY NMR spectrum (A) and 2D HSQC NMR spectrum(B) of EPS produced by <i>M. leachii</i> strain PG50.	104
Figure III.3: Staining of <i>Mmm</i> and <i>Mccp</i> profiles with Coomassie blue (A) and Schiff's reagent (B) and immunodétections of their EPS by Mabs (C).....	106
Figure III.4: Dot blot analysis of polysaccharides produced by MMC with Mabs 2.1.31 and 4.83.....	106
Figure III.5: Overview of the exopolysaccharide synthesis pathway in the <i>Mycoplasma mycoides</i> cluster.	108
Figure III.6: Synteny of the gene cluster surrounding a type II glycosyltransferase in the <i>Mycoplasma mycoides</i> cluster.	111

Annexes

Figure S1 : Northern blot hybridization of total RNA of the opaque (OP) and translucent (TR) colony variants of <i>Mmm</i> strain Afadé with a <i>cps</i> (MSC_0109) or rDNA 16S probe.	129
Figure S2 : Schematic representation of the predicted membrane topology of <i>Mmm</i> EpsG (MSC_0108) glycosyltransferase.	130
Figure S3 : Séquestre pulmonaire.	131
Figure S4 : Représentation du plasposon pMT85/2res avec le logiciel pDraw32.....	132
Figure S5: Dot blot analysis of polysaccharides produced by some <i>Mmc</i> serovar "LC" and <i>Mcc</i> strains with Mab 2.1.31 and Mab 4.83, respectively.	134
Figure S6: Agar gel immunoprecipitation of exopolysaccharides with a convalescent CBPP bovine serum.....	135
Figure S7: Protein phylogenetic trees with genes of the <i>Mycoplasma mycoides</i> cluster involved in their polysaccharides synthesis pathway.	137
Figure S8: Schematic representation of the phylogeny of the "Spiroplasma group" organisms in relation to their polysaccharide synthesis.	138

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

Table I.1 : Remaniements récents de la taxonomie du groupe «mycoides»..... 39

Table I.2 : Maladies causées par les mycoplasmes du groupe «*mycoides*» : hôtes, modes de transmission, occurrence, signes cliniques et lésions caractéristiques. 42

Chapitre II

Table II.1: Exopolysaccharide secretion and viability of Mmm strain Afadé in CMRL-1066 medium at the time of inoculation (T0) and after 72 h of incubation (T72)..... 79

Table II.2 : Gènes suspectés d’être impliqués dans la biosynthèse du galactane. 87

Chapitre III

Table III.1. Taxonomy of the mycoplasma mycoides cluster and genomic sequences used to study EPS biosynthetic pathways..... 95

Table III.2 : Strains used in chemical and immunological analyses..... 97

Table III.3: Quantities of EPS detected in extracts 102

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

L'introduction de maladies animales infectieuses exotiques représente un risque financier très élevé pour de nombreux pays où l'élevage participe activement à l'économie. Pour les pays en développement, ce risque est d'autant plus accru qu'une fraction de la population dépend directement de l'élevage pour sa survie. La réintroduction de la peste bovine en Europe au début du XXIème siècle a sensibilisé de nombreux pays à ce risque et fut à l'origine de la création de [l'office international des épizooties](#) (OIE), maintenant appelé organisation mondiale de la santé animale, dont le siège est à Paris, rue de Prony. Cet organisme international a d'ailleurs précédé la création d'autres organismes internationaux comme la société des nations dénommée aujourd'hui organisation des nations unies (ONU).

Un des rôles de l'OIE est de définir les règles qui président à la lutte contre ces maladies infectieuses et, en particulier, les règles non tarifaires de barrière aux frontières afin d'empêcher leur introduction dans un pays indemne. Ces règles doivent être acceptées au niveau international pour éviter les recours trop fréquents devant les tribunaux de l'organisation mondiale du commerce. Ainsi l'OIE établit des listes de maladies animales dont la déclaration est obligatoire, et prescrit les tests de référence à utiliser pour les confirmer. L'ensemble est inclus dans le "[Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres](#)" qui est régulièrement mis à jour. Pour la révision de ces textes, l'OIE s'appuie alors sur un ensemble de laboratoires internationaux de référence ainsi que des experts. Chaque pays désigne en général un laboratoire de référence chargé de réaliser les tests prévus en cas de suspicion et organiser un plan de surveillance.

La [péripleumonie contagieuse bovine](#) (PPCB) est une de ces maladies à déclaration obligatoire qui figure dans la liste de l'OIE. En effet celle-ci fut l'un des plus grands fléaux de l'élevage bovin au XIXème siècle et de nombreux pays ont réalisé des campagnes d'éradication coûteuses pour recouvrer un statut indemne. Il existe plusieurs laboratoires de référence OIE pour la PPCB, en Italie, au Portugal, au Botswana et en France. Pour la France ce sont en fait deux laboratoires qui sont associés, l'ANSES et le CIRAD. En effet l'[ANSES](#) est

un laboratoire dépendant du ministère de l'agriculture et il supervise les plans de surveillance en France alors que le [CIRAD](#) dépend des ministères de la recherche et des affaires étrangères. Le CIRAD s'occupe principalement de projets collaboratifs avec de nombreux pays dans le monde où cette maladie est encore présente, particulièrement sur le continent africain.

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre l'ANSES et le CIRAD afin de renforcer les liens entre les deux équipes travaillant sur la PPCB pour en améliorer la surveillance et le contrôle. Le choix d'un sujet portant sur les polysaccharides des mycoplasmes du groupe « mycoides » a été fait en commun et a résulté de plusieurs constatations. Tout d'abord, il n'existe que très peu de données récentes sur ce type de molécule chez les mycoplasmes pathogènes de ruminants, bien que ces produits aient été identifiés très précocement comme des facteurs de virulence potentiels. Par ailleurs, une meilleure connaissance de ces molécules pouvait laisser entrevoir le développement de produits avec des applications pour le diagnostic et les vaccins. Cela est important pour l'ANSES et le CIRAD dont l'un des objectifs principaux est de réaliser des recherches appliquées. Cependant aucun des deux laboratoires n'avait d'expérience concernant la caractérisation des polysaccharides et c'est pourquoi une collaboration supplémentaire a été recherchée auprès d'un laboratoire spécialisé, le [Laboratoire des Polysaccharides Microbiens et Végétaux](#) (LPMV) de [l'Institut Universitaire de Technologie](#) (IUT) d'Amiens.



CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La classe des Mollicutes et le groupe «mycoides»

I.1. La classe des Mollicutes

C'est en 1898 que le premier Mollicute fut isolé et cultivé (**Nocard**, 1898). Sa ténuité lui valu d'être catégorisé en tant qu' « ultravirus » regroupant, à l'époque, et en France, les agents « filtrables ». *Asterococcus mycoides* fut le premier nom de cet organisme, agent de la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB), proposé sur la base d'observations microscopiques suggérant des filaments pseudo-mycéliens dans les cultures (**Borrel**, 1910). Sur cette même base, le nom de genre *Mycoplasma* lui fut attribué en 1929 par Nowak et fut légitimé définitivement en 1955 par Edward (**Edward**, 1955). Cette bactérie est aujourd'hui connue sous le nom de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. En 1967, Edward et Freundt proposèrent officiellement de nommer cette classe de bactéries Mollicutes (**Edward & Freundt**, 1967). *Mycoplasma* étant le genre le plus répandu de cette classe, ces organismes sont souvent désignés, à titre trivial, mycoplasmes.

I.1.1. Caractéristiques majeures de la classe des Mollicutes

Les Mollicutes sont le fruit d'une évolution régressive par perte massive de gènes à partir d'un ancêtre commun avec les bactéries à Gram positif et constituant, à cette issue, la plus petite unité procaryote douée de réplication autonome connue à ce jour (**Fraser, et al.**, 1995). Le terme Mollicute vient du latin *molli* (mou, doux) et *cutis* (peau) et rend compte de l'une des caractéristiques principales de ces bactéries : l'absence de paroi rigide. Cette déficience explique leur aspect pléiomorphe (**Fig. I.1**), à l'exception des spiroplasmes qui adoptent préférentiellement une forme hélicoïdale due à la présence d'un cytosquelette (**Razin, et al.**, 1998). L'absence de paroi n'est pas le seul caractère remarquable des Mollicutes, les différenciant ainsi des autres eubactéries. En effet, les membres de cette classe sont de petite taille, entre 0,3 et 0,8 µm de diamètre, contre 2µm de long sur 0,8µm de diamètre pour *Escherichia coli*. Ils présentent un génome de taille réduite (0,58 Mpb pour *Mycoplasma genitalium* à 2,2 Mpb pour *Spiroplasma ixodetis* contre 4,6Mpb pour *E. coli*) avec un faible taux de moles en G+C (23 à 40% contre 50% pour *E. coli*). Par ailleurs, ils mettent à profit majoritairement le codon UGA comme codon tryptophane sauf pour les

acholeplasmes et les phytoplasmes qui l'utilisent en tant que codon stop tel que décrit dans le code génétique universel (**Blanchard, 1990**).

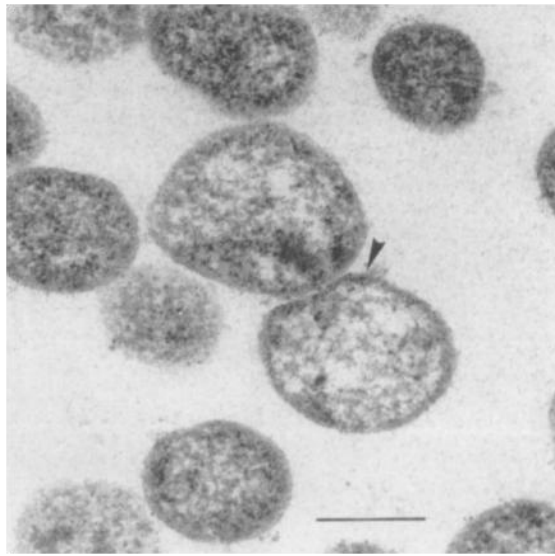


Figure I.1 : Section ultrafine de cellules mycoplasmiques observées en microscopie électronique.

Les mycoplasmes présentent un aspect pléiomorphe dû à l'absence de paroi rigide à peptidoglycane. La flèche désigne la membrane plasmique et la barre d'échelle représente 200 nm (**Kobayashi, et al., 1997**).

Outre la perte de la capacité de synthèse de peptidoglycane, les Mollicutes sont également incapables de synthétiser leurs propres acides gras, acides aminés, précurseurs d'acides nucléiques ou encore certaines vitamines et autres coenzymes. Excepté les phytoplasmes et les acholéplasmes, ils doivent également importer les stérols (cholestérol ou phytostérol) exogènes nécessaires à leur architecture membranaire. De ce fait, les Mollicutes sont définis comme des parasites obligatoires ou saprophytes et sont capables de coloniser un large spectre d'hôtes tels que les plantes (le plus souvent *via* des arthropodes vecteurs), les humains et les animaux. Ce parasitisme est corrélé à la perte de nombreux gènes voire de voies métaboliques complètes que ces eubactéries ont subi au cours de leur évolution (**Pollack, et al., 1997**). Pour leur culture *in vitro*, les milieux doivent être enrichis en extrait de levures fraîches, en sérum animal et en glucose afin d'apporter les éléments garantissant leur croissance. Pour certains espèces de culture fastidieuse, tel que *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, la croissance peut être améliorée grâce à l'ajout de pyruvate dans le milieu (**Miles, et al., 1988**). Cultivés sur gélose, les mycoplasmes forment des colonies dites en « œuf sur le plat » (**Fig. I.2**) définies par une zone foncée

centrale, enfoncée « en clou » dans la gélose et entourée d'une zone claire périphérique en surface de la gélose (Razin & Oliver, 1961).

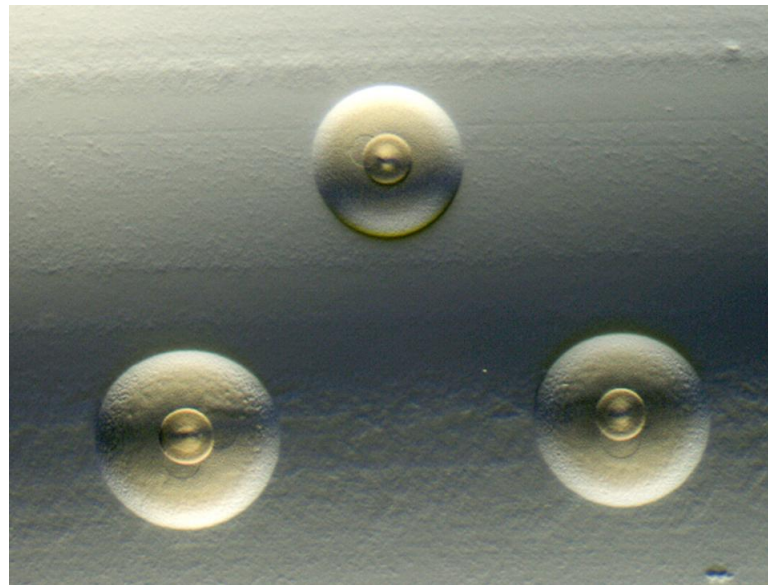


Figure I.2 : Observation de colonies de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* cultivées en milieu gélosé.

L'éclairage latéral rasant permet de bien distinguer la surface plus ou moins lisse de la colonie ainsi que sa partie centrale plus foncée, s'enfonçant dans la gélose. (Crédits photo : François Thiaucourt, Clothilde Bertin)

I.1.2. Classification

Les *Mollicutes* appartiennent à la division des Ténéricutes qui regroupe des bactéries sans paroi. La classe se divise en deux branches majeures : la branche Acholeplasme-Anaéroplasme-Phytoplasme (AAP) avec les genres *Acholeplasma*, *Anaeroplasm*, *Asteroleplasma* et *Candidatus Phytoplasma* et la branche Spiroplasme-Entomoplasme-Mycoides (SEM) incluant les genres *Spiroplasma*, *Mesoplasma*, *Mycoplasma*, *Entomoplasma* et *Ureaplasma* (Maniloff, 2002).

Pendant très longtemps, la classification des mycoplasmes a reposé sur des analyses diverses comme l'hybridation d'ADN total, la taille du génome, le pourcentage de G+C et surtout l'inhibition de croissance observée avec un panel de sérums hyperimmuns de référence. En effet, les tests phénotypiques couramment utilisés pour les bactéries, comme la coloration de Gram, la morphologie des cellules, la mobilité ou les profils de fermentation de substrats carbonés par exemple, ne sont pas utilisables pour les mycoplasmes. Cependant

ce mode de classification a un certain nombre d'inconvénients. Notamment, il ne permet pas de positionner des espèces non cultivables, il nécessite de disposer de l'ensemble des sérums hyperimmuns de référence et les analyses peuvent aussi être biaisées par le fait que l'inhibition de croissance n'est pas une technique universelle (toutes les souches d'une même espèce ne sont pas inhibées par un seul sérum) ni spécifique (les croisements sérologiques demeurent plus ou moins importants).

Il existe maintenant un certain consensus pour estimer que la classification des procaryotes devrait refléter la distance évolutive entre les groupes d'individus c'est-à-dire la phylogénie (**ANNEXE I**).

1.1.2.1. Phylogénie

Des analyses d'arbres phylogénétiques basés sur les ADNr 16S, corrélées avec les données des changements géologiques et paléontologiques induits durant l'histoire de la Terre, datent les premiers *Mollicutes* d'environ 605 millions d'années contre environ 3 milliards d'années pour les premières bactéries (**Maniloff**, 2002). Ils auraient évolué à partir d'un ancêtre à Gram positif et à faible taux en G+C (**Woese**, 1987).

Il a été démontré que les *Mollicutes* évoluent plus rapidement que les autres bactéries (**Woese, et al.**, 1984, **Woese**, 1987). Cet argument est supporté par leur positionnement parmi les plus longues branches de l'arbre universel de vie (**Fig. 1.3**) (**Ciccarelli, et al.**, 2006).

La classification des *Mollicutes*, basée sur les séquences des ADNr 16S, présentée **Figure 1.4**, montre quatre groupes phylogénétiques distincts : les groupes *Spiroplasma*, *Hominis*, *Pneumoniae* et *Phytoplasma/Acholeplasma* (**Sirand-Pugnet, et al.**, 2007a).

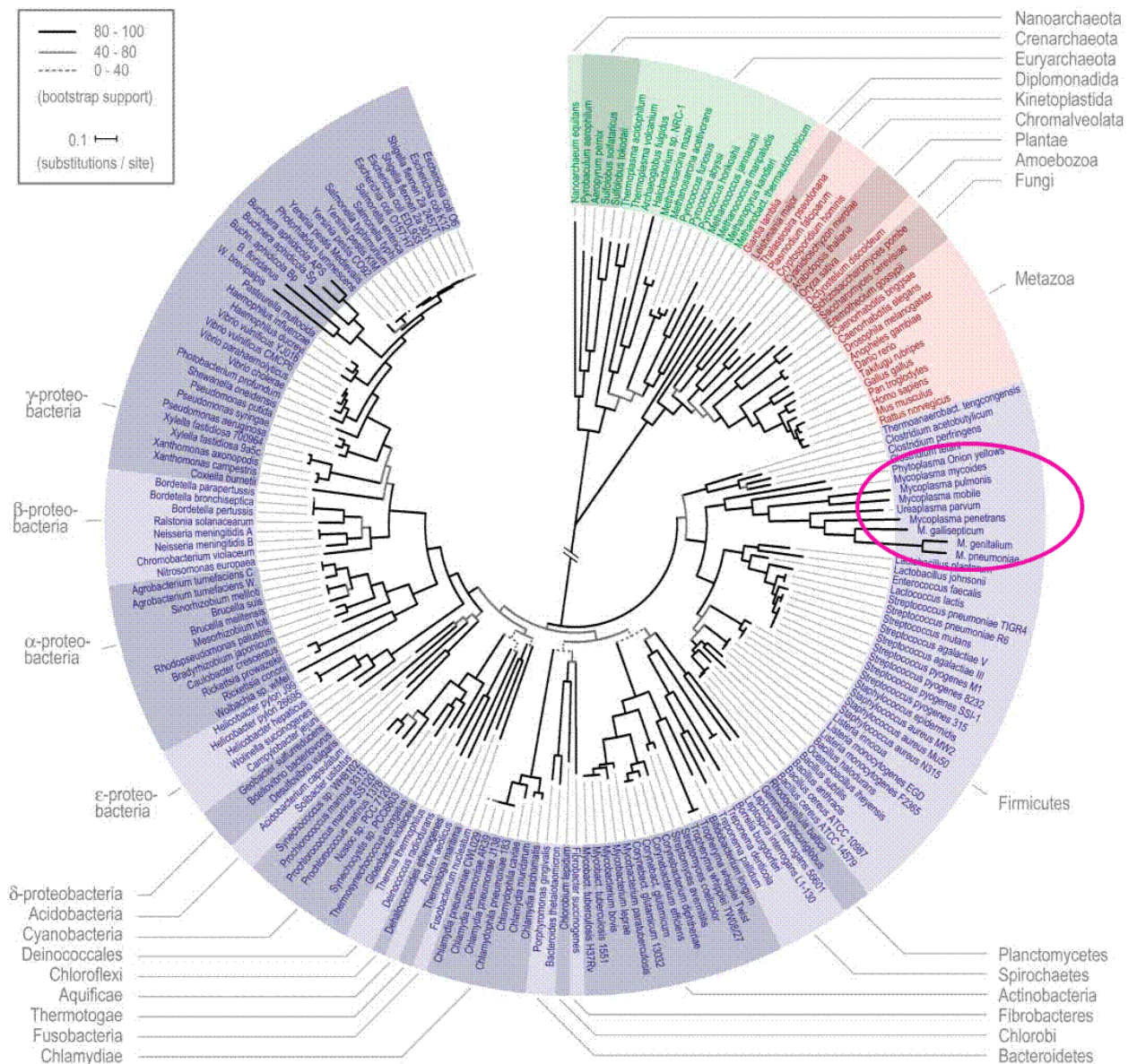


Figure I.3 : Arbre de vie.

Arbre phylogénétique basé sur l'alignement de 31 familles universelles de protéines concaténées de 191 organismes dont le génome est entièrement séquencé (Ciccarelli, *et al.*, 2006). Les Mollicutes, entourés en rose, figurent parmi les plus longues branches de l'arbre.

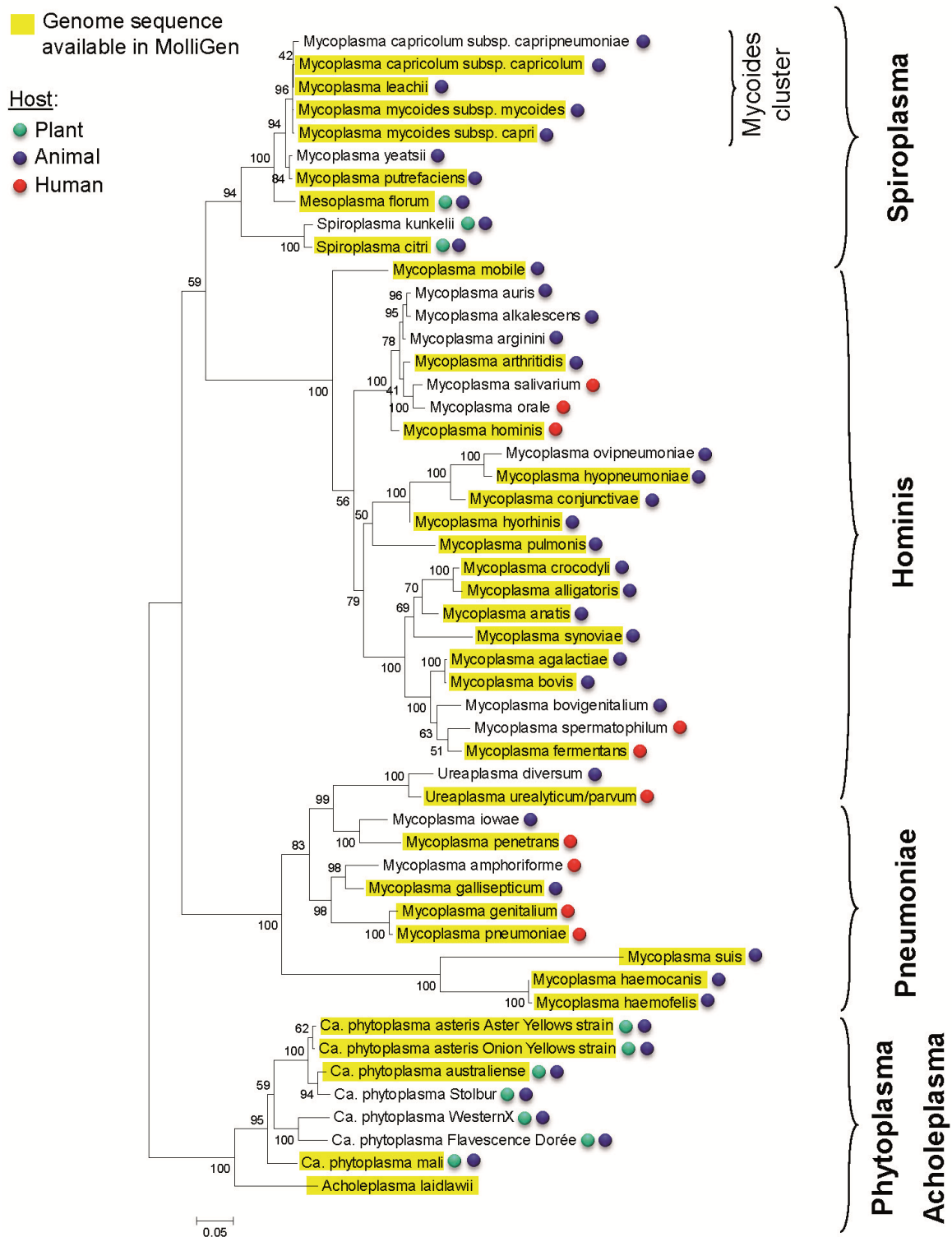


Figure I.4 : Arbre phylogénétique de la classe des Mollicutes basé sur les séquences d'ADNr 16s et établi selon l'estimation du maximum de vraisemblances.

Tiré de la base de données [Molligen](#) (Barré, *et al.*, 2004, Sirand-Pugnet, *et al.*, 2007a). Le surlignage jaune indique que la séquence du génome d'une ou plusieurs souches de l'espèce est disponible dans Molligen. Les points de couleur correspondent au type d'hôte infecté par le mycoplasme (vert : les plantes, bleu : les animaux et rouge : les humains)

I.1.2.2. Taxonomie

La classe des *Mollicutes* est subdivisée en 4 ordres, 5 familles et 8 genres (**Razin, et al.**, 1998), si l'on ne tient pas compte des organismes *incertae sedis* (*Eperythrozoon* et *Haemobartonella*) et du genre *Candidatus Phytoplasma* (**Krieg, et al.**, 2010).

L'ordre des *Mycoplasmatales* comprend 1 seule famille *Mycoplasmataceae* et 2 genres : *Mycoplasma* et *Ureaplasma*. Les *Mycoplasmatales* infectent les hommes et les animaux. Ces organismes ont besoin de cholestérol pour leur croissance et sont principalement aérobies. Les bactéries du genre *Ureaplasma* ont la particularité d'hydrolyser l'urée. *Mycoplasma* est le genre le plus représentatif de la classe des *Mollicutes*. Récemment, sur la base d'analyses des ADNr 16S, quatre membres des genres *Haemobartonella* et *Eperythrozoon* de l'ordre des *Rickettsiales* ont été rattachés à l'ordre des *Mycoplasmatales* et se sont vu attribuer le nom de genre *Mycoplasma* (**Neimark, et al.**, 2001, **Neimark, et al.**, 2002). Cependant l'inclusion de ces espèces dans le genre *Mycoplasma* a été contestée en raison de leur distance évolutive avec d'autres mycoplasmes telle que constatée sur l'ADNr 16S (**Uilenberg, et al.**, 2004, **Uilenberg, et al.**, 2006).

L'ordre des *Entomoplasmatales* regroupe des bactéries isolées chez les arthropodes et à la surface, voire dans le phloème des plantes. Il se divise en 2 familles : les *Entomoplasmataceae* avec les genres *Mesoplasma* et *Entomoplasma* et les *Spiroplasmataceae* ne comprenant que le genre *Spiroplasma*. Ils sont plus ou moins exigeants en stérols.

L'ordre des *Acholeplasmatales* présente 1 famille *Acholeplasmataceae* et 1 seul genre : *Acholeplasma*. Ils ne nécessitent pas l'apport de stérols. Leurs hôtes sont des mammifères, des insectes ou encore des plantes. Le genre *Candidatus Phytoplasma* est toutefois rattaché à cet ordre bien que son statut taxonomique reste incertain du fait de l'impossibilité de cultiver ces organismes *in vitro*. Les phytoplasmes se multiplient chez les insectes et dans les tubes criblés du phloème.

L'ordre des *Anaeroplasmatales* est constitué de 1 famille *Anaeroplasmataceae* et de 2 genres : *Anaeroplasma* et *Asteroleplasma*. Ils sont isolés de la panse des ruminants et sont exclusivement anaérobies. Leur croissance nécessite du cholestérol.

Dans les classifications récentes, la taxonomie est censée refléter la phylogénie établie à partir des séquences d'ADNr 16S. Ce consensus est actuellement encore en cours de formulation rigoureuse par les comités de taxonomie (**Brown, et al., 2007, Firrao & Brown, 2011, Firrao & Brown, 2013**). Ainsi, des espèces du genre *Mycoplasma* se trouvent dans des branches distinctes et, par ailleurs, une même branche regroupe des genres différents. Les avancées rapides des techniques de séquençage, telles que les analyses MLST, aboutiront, à terme, à des règles plus claires permettant de définir les genres et les espèces (**Garrrity, et al., 2004**).

I.1.3. Les Mollicutes, des génomes petits mais complexes

Les Mollicutes ont longtemps été considérés comme un « cul-de-sac » évolutif. Pourtant, en dépit de leur petit génome, ils s'avèrent être des bactéries en rapide évolution et capables de mettre en œuvre des voies métaboliques complexes. De nouvelles espèces sont régulièrement découvertes au-fur-et-à-mesure qu'ils sont recherchés chez de nouveaux hôtes. L'analyse des génomes progressivement disponibles rend compte d'un grand dynamisme que ce soit au travers des pertes ou des gains de matériel génétique subis au cours de leur évolution.

Pendant longtemps, la perte de gènes a semblé être la tendance évolutive commune à ces bactéries, la plus emblématique étant bien sûr la perte de la capacité à synthétiser une paroi. L'analyse de génomes complets de 15 espèces de mycoplasmes a montré que le core génome de cet ensemble est finalement assez restreint : 211 clusters de groupes de gènes orthologues (COGs) partagés pour un total de 697 identifiés (**Sirand-Pugnet, et al., 2007b**). Cela peut s'expliquer par le fait que les réductions de génome auraient pu affecter des éléments divers d'une espèce à l'autre, ne laissant en commun que ce qui est strictement indispensable (le core génome).

Cependant, outre la petite taille du core génome, un autre phénomène semble jouer un rôle majeur dans l'évolution des mycoplasmes et dans le maintien de la diversité des COGs hors core génome : les transferts latéraux de gènes (HGT). Ces événements semblent

fréquents car ils apparaissent à de nombreuses localisations du génome, associés ou non à des réarrangements chromosomiques (**Sirand-Pugnet, et al.**, 2007b).

A titre d'exemple, il apparaît qu'en dépit de l'éloignement phylogénétique *M. agalactiae* partage 18% de son génome avec *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* et *M. putrefaciens*, la communauté d'hôtes ayant favorisé des événements de HGT (**Sirand-Pugnet, et al.**, 2007a).

Par ailleurs, des travaux sur le pathogène humain *M. pneumoniae* apportent une vue d'ensemble détaillée sur la génomique, la transcriptomique ainsi que la protéomique de ces organismes et prouvent que les mycoplasmes montrent des réponses métaboliques similaires à des bactéries plus complexes tout en mettant en jeu des mécanismes de régulation encore inconnus (**Guell, et al.**, 2009, **Yus, et al.**, 2009, **Yus, et al.**, 2012).

M. genitalium possède le plus petit génome des organismes autorépliquatifs. Par conséquent, il n'est pas étonnant que son génome ait été étudié afin de définir le set minimum de gènes essentiels à la vie bactérienne. L'insertion aléatoire de transposon dans son génome a permis d'écarter plus d'une centaine de gènes non indispensables à la cellule sur les 485 séquences codantes recensées (**Hutchison, et al.**, 1999, **Glass, et al.**, 2006). Ces travaux ont ouvert la voie à la production de la première bactérie de synthèse obtenue par transplantation d'un génome artificiel dérivant d'un génome de *M. mycoides* subsp. *capri* (GM12) manipulé préalablement dans la levure puis, transféré dans une cellule receveuse (**Lartigue, et al.**, 2007, **Lartigue, et al.**, 2009, **Gibson, et al.**, 2010). Ces recherches constituent un grand pas dans la production industrielle de molécules d'intérêt tout en posant des questions d'éthique dans l'utilisation de cette technologie (**Montague, et al.**, 2012).

Au final, les avancées dans la connaissance de ces génomes donne la vision d'une évolution qui, loin d'être linéaire, suivrait un chemin chaotique. Leur génome réduit mais d'une grande complexité résulterait d'une hybridation aléatoire au gré des autres espèces présentes dans leur environnement naturel.

I.2. Le groupe « mycoides »

I.2.1. Présentation du groupe « mycoides »

Le groupe « mycoides », classé dans le groupe phylogénétique *Spiroplasma*, désigne un ensemble de mycoplasmes pathogènes des ruminants. La majorité des membres de ce groupe sont responsables de maladies chez les bovins ou les caprins entraînant de lourdes pertes économiques dans le monde entier, justifiant la mise en place de plans de lutte au niveau mondial et leur inscription sur les listes de l'OIE.

A l'heure actuelle, le groupe «mycoides» se compose de cinq membres (**Manso-Silvan, et al., 2009**):

- *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (Mmm)
- *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc)
- *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc)
- *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp)
- *Mycoplasma leachii* (*M. leachii*)

Trois autres espèces de mycoplasmes, hébergées par les mêmes hôtes et également classées dans le groupe phylogénétique *Spiroplasma*, sont assez proches phylogénétiquement des membres du groupe «mycoides» : *M. putrefaciens*, *M. cottewii* et *M. yeatsii* (**Manso-Silvan, et al., 2007**). Récemment, le génome d'une souche isolée chez des caprins sauvages a été séquencé. Elle s'avère être très proche du groupe «mycoides» et constitue une nouvelle espèce : *M. feriruminatoris* (**Fischer, et al., 2013, Jores, et al., 2013**).

I.2.1.1. Identification et classification

L'existence du groupe « mycoides » se justifie par les nombreuses similitudes sur les plans génétiques, biochimiques ou encore antigéniques que ces bactéries partagent, rendant leur classification et/ou leur identification des plus délicates (**Weisburg, et al., 1989, Pettersson, et al., 1996**). Ces mycoplasmes, bien que très proches entre eux, sont en

revanche à l'origine de maladies très différentes et dont les impacts économique et législatif sont totalement distincts. Il est donc impératif de différencier ces agents avec précision.

Avant l'arrivée des techniques de phylogénie actuelles, leur classification et leur identification était essentiellement basée sur les tests d'inhibition de croissances (IC) complétés par des tests biochimiques ou encore des caractéristiques de croissance (**Cottew, et al., 1987**). Le groupe «mycoides» était alors divisé en six taxons (**Table I.1**) : *Mmm* biotype Small Colony (*MmmSC*), *Mmm* biotype Large Colony (*MmmLC*), *Mmc*, *Mcc*, *Mccp* et les mycoplasmes pathogènes bovins du groupe 7 de Leach (MBG7) (**Cottew, et al., 1987**).

	"Groupe Mycoides"					
	Sous-groupe mycoides			Sous-groupe capricolum		
Taxonomie de 1987 ^a	<i>M. m. subsp. capri</i>	<i>M. m. subsp. mycoides LC</i>	<i>M. m. subsp. mycoides SC</i>	<i>M. sp. Groupe7</i>	<i>M. c. subsp. capricolum</i>	<i>M. c. subsp. capripneumoniae</i>
Taxonomie actuelle ^b	<i>M. m. subsp. capri</i>	<i>M. m. subsp. mycoides</i>		<i>M. leachii</i>	<i>M. c. subsp. capricolum</i>	<i>M. c. subsp. capripneumoniae</i>

Table I.1 : Remaniements récents de la taxonomie du groupe «mycoides».

^a basé sur Cottew et al. 1987 (**Cottew, et al., 1987**)

^b basé sur Manso-Silvan et al. (**Manso-Silvan, et al., 2007, Manso-Silvan, et al., 2009**)

M. m.: *Mycoplasma mycoides*, *M. c.*: *Mycoplasma capricolum*

Les réactions croisées lors des tests d'inhibition de croissance étaient fréquentes notamment entre *MmmSC* et *MmmLC*, lesquels étaient néanmoins différenciables par la taille de leurs colonies, leur résistance à 45°C ou encore leur capacité à digérer le sérum coagulé (**Cottew & Yeats, 1978**).

De nouveaux tests d'identification plus rapides et basés soit sur la reconnaissance immunologique par « dot blot membrane filtration » (**Poumarat, et al., 1992**) soit sur l'amplification de séquences spécifiques par PCR (**Le Grand, et al., 2004**) ont été élaborés afin de répondre à une demande croissante de tests, notamment en France dans le cadre du projet [VIGIMYC](#). Un nouveau degré de difficulté est alors apparu dans l'identification au sein de ce groupe. Si les taxons *MmmSC* et *Mccp* se sont avérés extrêmement homogènes, il n'en est pas du tout de même pour *MmmLC*, *Mmc*, *Mcc* et MBG7. Leur antigènes de surface

peuvent présenter une composition extrêmement variable au sein d'une population clonale et, paradoxalement, des proximités antigéniques assez intimes entre les différents taxons pour causer des réactions croisées (**Le Grand, et al., 2004, Tardy, et al., 2009**).

Ainsi, ce n'est que récemment qu'une nouvelle classification a pu être proposée. Les résultats des analyses des ADNr 16S et de la séquence d'une protéine membranaire putative menées sur le groupe «mycoïdes» ont conduit à proposer d'unir *MmmLC* et *Mmc* en une seule entité (**Pettersson, et al., 1996, Thiaucourt, et al., 2000**). Ces résultats, appuyés par une phylogénie sur cinq gènes de ménages concaténés (**Figure I.5**), ont abouti à la réunification de *Mmc* et *MmmLC* en une seule sous-espèce *capri* -elle-même divisée en deux sérovars : « LC » et « capri »- et ont renforcé les données de phylogénie précédentes au sujet de la proximité de MBG7, *Mccp* et *Mcc* (**Manso-Silvan, et al., 2007**).

Plus récemment, le nom de *M. leachii* a été assigné aux MBG7, les positionnant au statut d'espèce à part entière (**Manso-Silvan, et al., 2009**). Jusque là, les analyses rendaient compte d'une espèce génétiquement chimère à l'interface des espèces *mycoïdes* et *capricolum* mais ne permettaient pas un détachement net de l'espèce (**Manso-Silvan, et al., 2009, Tardy, et al., 2009, Fischer, et al., 2012**).

Enfin, des approches Bayésiennes ont permis de réaliser des analyses de datation moléculaire pour l'ensemble du groupe «mycoïdes». Les variations observées sur 7 gènes d'un système de typage MLST ont permis d'évaluer l'apparition de l'ancêtre commun du groupe à environ 10 000 ans (**Fischer, et al., 2012**). Une approche similaire a été utilisée pour dater l'apparition de l'ancêtre de l'ensemble des souches de *Mmm*. Cependant, ce pathogène étant très monomorphe, il a été nécessaire de sélectionner un ensemble de 63 gènes du core génome pour obtenir un polymorphisme significatif. Les conclusions de l'étude montrent notamment que l'ancêtre des souches de *Mmm* serait apparu il y a seulement 300 ans (**Dupuy, et al., 2012**). Les comparaisons des génomes complets de *Mmm* et *Mmc* indiquent par ailleurs que *Mmm* a certainement résulté d'un saut d'espèce à partir d'une souche de *Mmc* inféodée aux petits ruminants pour s'adapter ensuite aux bovins (**Thiaucourt, et al., 2011**). De plus les analyses de datation moléculaire sur *Mmm* ont montré que l'ancêtre des souches circulant en Afrique serait apparu vers 1800 à une époque où la PPCB était bien connue en Europe. Il est donc fort vraisemblable que la PPCB ait été introduite en Afrique Sub-saharienne au moment de la colonisation.

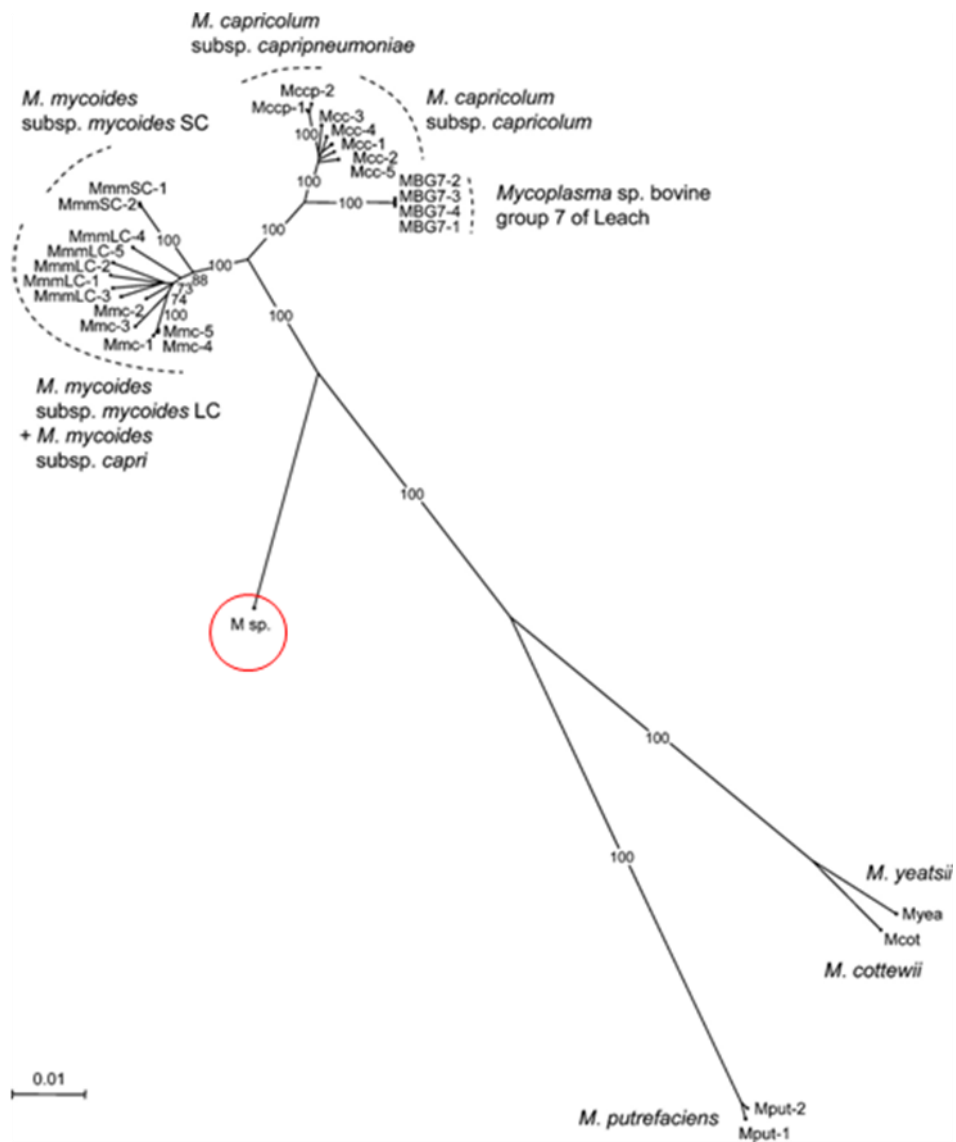


Figure I.5 : Arbre phylogénétique du groupe « mycoides » réalisé par la méthode du plus proche voisin avec les séquences concaténées de cinq gènes de ménage (Manso-Silvan, *et al.*, 2007).

La branche reliant une souche *M. sp.* (entourée de rouge, souche 8756, CIRAD) au groupe « mycoides » correspond sans doute à la nouvelle espèce *M. feriruminatoris* telle que décrite par Jöres, *et al.* (Jöres, *et al.*, 2013).

1.2.1.2. Les maladies ou syndromes induits par les membres du groupe «mycoides»

Mis à part *M. leachii*, les autres membres du groupe «mycoides» sont les agents causals de trois maladies notifiées sur les listes de [l'office international des épizooties](#) de l'organisation mondiale de la santé animale : la PPCB, la pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) et le syndrome d'agalaxie contagieuse. La **Table I.2** présente les modes de transmission, signes cliniques et lésions typiques de ces pathologies.

MALADIE	AGENT(S) INFECTIEUX	HÔTES PRINCIPAUX (PORTAGE)	TRANSMISSION	OCCURRENCE	SIGNES CLINIQUES	LESIONS TYPIQUES
PPCB	Mmm	Bovins, buffle domestique (caprins, ovins)	Aérosols Fluides (urine, salive)	Afrique subsaharienne	Adultes : pertes d'appétit, fièvres, difficultés respiratoires. Formes aiguë ou chronique Jeunes: arthrites	Pneumonie unilatérale, marbrures, oedèmes, fibroses, séquestres, pleurésies
PPCC	Mccp	Caprins (ovins et faune sauvage)	Aérosols	Afrique de l'Est, Afrique centrale, Proche orient, Asie, Europe (Turquie)	Forme aiguë: anorexie, toux, difficultés respiratoires, mort 1 à 10j Forme chronique: toux, écoulement nasal, débilitation	Pleurésie, fibroses, hépatisation, granulations, pneumonie unilatérale
Agalaxie contagieuse - mammites - arthrites - kératoconjunctivites - pneumonies - septicémies (MAKePS)	Mmc Mcc (hors groupe mycoides : <i>M. Agalactiae</i> , <i>M. Putrefaciens</i>)	Caprins et ovins (bovins)	Aérosols Fluides (salive, cérumens, fécès,) Lactation Traite des animaux	Europe, U.S.A, Asie (Inde), Afrique du Nord, Australie	mammites, arthrites, kératoconjunctivites Plus rare : pneumonies voire pleuropneumonies, septicémies	
Infection à <i>M. Leachii</i> - mammites - arthrites	<i>M. leachii</i>	Bovins, principalement les veaux (caprins, ovins)	Lactation Sperme	Partout dans le monde	Adultes : mammites, avortements, pneumonies (rare) Jeunes : polyarthrites	Déformations articulaires permanentes

Table I.2 : Maladies causées par les mycoplasmes du groupe «mycoides» : hôtes, modes de transmission, occurrence, signes cliniques et lésions caractéristiques.

Maladies des bovins

La **PPCB**, exclusivement causée par *Mmm* (encore désigné « *MmmSC* » dans le chapitre de l'OIE), était il y a encore deux siècles, un fléau mondial au même titre que la peste bovine et fut à l'origine de la création des écoles vétérinaires françaises (**Provost**, 1987).

Mmm infecte seulement les bovidés du genre *Bos* (bovins ou zébus) et le Yak. *Mmm* a été isolé chez le buffle domestique (*Bubalus bubalis*) en Italie et également sporadiquement chez des caprins et ovins en Afrique, au Portugal et en Inde (**Srivastava, et al.**, 2000). La PPCB se manifeste par des symptômes d'anorexie, de fièvres et des signes respiratoires tels que des dyspnées, de la toux ainsi que des écoulements nasaux durant la phase aiguë de la maladie. Les lésions typiques incluent une pneumonie unilatérale associée à de la pleurésie. Durant les phases chroniques et subaigües, les signes cliniques s'estompent et la maladie est plus difficile à détecter. Les poumons présentent alors des lésions typiques nommées "séquestres" (**Annexe III-Figure S3**).

La PPCB aurait été limitée à certaines régions d'Europe au XVIII^{ème} siècle puis, avec les échanges commerciaux de bovins, elle se serait répandue dans le monde entier durant la seconde moitié du XIX^{ème} siècle. Au début du XX^{ème} siècle, la maladie fut éradiquée de nombreux pays soit par des stratégies d'abattages (Etats-Unis d'Amérique ou Grande Bretagne), soit par des campagnes de vaccinations suivies de stratégies d'abattages (Australie). L'Europe a été considérée indemne de PPCB dès les années 1900 mais des résurgences régulières sont apparues dans le sud (France, Portugal et Italie), les derniers foyers datant de 1999 (**Regalla, et al.**, 1996). Aujourd'hui la PPCB est enzootique dans de nombreux pays d'Afrique sub-saharienne et la situation de l'Asie est mal évaluée en raison d'une surveillance imparfaite.

Les animaux en phase aiguë sont responsables de l'expansion rapide de la maladie et ceux en phase chronique, probablement de sa persistance à long terme. Les petits ruminants et la faune sauvage ne jouent, à priori, pas de rôle dans la dissémination.

Les mesures de contrôle sont basées sur l'abattage, la vaccination, les contrôles des mouvements animaux et parfois, les traitements antibiotiques. La vaccination est

actuellement réalisée à l'aide d'un vaccin vivant préparé avec une souche atténuée par passage. La protection n'est que de quelques mois, de plus la souche conserve un certain pouvoir pathogène. L'usage des antibiotiques est très controversé. En effet, ils masquent la maladie entravant la prophylaxie et accroissent le risque d'apparition de résistance si leur usage n'est pas bien encadré. Les symptômes de la PPCB ne sont pas spécifiques et même si les lésions sont très caractéristiques, d'autres infections peuvent provoquer à l'occasion des tableaux lésionnels similaires. La présence de *Mmm* doit donc être impérativement confirmée surtout dans les cas de réémergence de foyers dans un pays déclaré indemne par l'OIE. Les tests sérologiques prescrits sont les tests de fixation par le complément (CFT) et l'ELISA de compétition (**Le Goff**, 1986). De plus, il existe maintenant plusieurs tests PCR spécifiques détectant exclusivement *Mmm* voire la souche vaccinale de type T1 (**Dedieu, et al.**, 1994, **Lorenzon, et al.**, 2000, **Lorenzon, et al.**, 2008)

Les mycoplasmoses à *M. leachii* sont caractérisées par des mammites et des arthrites chez les bovins. Les cas répertoriés rendent compte de foyers ponctuels sur tous les continents, comme récemment en Chine et en Australie, le premier cas ayant été rapporté dans les années 60 (**Simmons & Johnston**, 1963, **Chang, et al.**, 2011). Les modes de transmission et l'impact économique de ces maladies restent encore mal documentés (**Hum, et al.**, 2000).

Maladies des petits ruminants (caprins et ovins)

La **PPCC** est une maladie sévère affectant principalement les caprins mais également la faune sauvage (**Arif, et al.**, 2007, **Yu, et al.**, 2013). La première description de la maladie date de 1873 en Algérie (**Thomas**, 1873) et l'agent responsable, *Mccp*, a été identifié en 1976 au Kenya (**MacOwan & Minette**, 1976). La forme aiguë de la maladie est caractérisée par une pleuropneumonie séro-fibrineuse unilatérale accompagnée de sévères effusions pleurales (**Thiaucourt & Bolske**, 1996).

On croyait la PPCC limitée à la corne de l'Afrique dont le Soudan et l'Ethiopie mais, avec l'amélioration des moyens diagnostics, il s'est avéré que sa distribution est beaucoup plus

large dans de nombreux pays tels que la Tunisie, la Turquie, la Chine et le Tadjikistan (**Thiaucourt & Bolske**, 1996, **Hadush, et al.**, 2009, **Manso-Silvan, et al.**, 2011). Des foyers de la maladie ont pour la première fois été rapportés sur le territoire européen en 2004 en Thrace (**Ozdemir, et al.**, 2005). Lors de foyers dans des cheptels mixtes, les ovins peuvent être infectés tout en restant sains et leur rôle en tant que potentiel réservoir est à prendre en compte. La présence de la PPCC a par ailleurs été confirmée dans la faune sauvage dans une réserve du Qatar avec des taux significatifs de mortalité et de morbidité (**Arif, et al.**, 2007).

Au même titre que la PPCB, la PPCC n'est pas une zoonose et l'identification de l'agent responsable doit être effectuée afin d'éviter la confusion avec notamment la peste des petits ruminants ou une pasteurellose. Le diagnostic peut être conduit par des tests sérologiques tels que l'ELISA de compétition ou des tests de fixation du complément (CFT). L'isolement de *Mccp* étant fastidieux, une détection de l'agent par PCR avec des amorces spécifiques de *Mccp* à partir de prélèvements est la méthode recommandée pour la confirmation de l'existence de foyer de PPCC (**Woubit, et al.**, 2004). Les méthodes de lutte contre la PPCC sont similaires à celles de la PPCB. La seule exception notable est que les vaccins contre la PPCC sont des vaccins de type inactivés-adjuvés, beaucoup plus coûteux à produire et entraînant une séro-conversion durable qui peut interférer avec le dépistage sérologique.

L'**agalactie contagieuse** est un syndrome qui peut être provoqué par quatre agents infectieux différents : *Mmc*, *Mcc*, *M. putrefaciens* et *M. agalactiae* chez les caprins (**Cordy, et al.**, 1955, **Laws**, 1956, **Tully, et al.**, 1974) et les ovins. *M. agalactiae* est à l'origine de 80% des cas d'agalaxie chez les brebis. Ce mycoplasme appartient au groupe *Hominis*, éloigné phylogénétiquement du groupe *Spiroplasma* auquel appartiennent les trois autres mycoplasmes (**Gomez-Martin, et al.**, 2013). L'agalaxie contagieuse occasionne des symptômes graves et très polymorphes. Le « syndrome MAKEPS » -respectivement : mammites, arthrites, kératoconjunctivites, pneumopathies et septicémies- est le nom attribué pour l'ensemble des symptômes de la maladie les plus couramment décrits (**Thiaucourt & Bolske**, 1996). Les cas de pneumopathies et de septicémies sont surtout

relatés pour *Mmc* et *Mcc* tandis que *M. putrefaciens* est essentiellement associé à des mammites.

Mcc et *M. agalactiae* ont déjà été isolés chez des petits ruminants sauvages tels que les ibex ou les chèvres des montagnes (Tardy, et al., 2012). L'agalaxie contagieuse est décrite dans le monde entier et son impact sur l'économie est particulièrement important sur le pourtour méditerranéen et l'Asie.

Le diagnostic définitif requiert l'isolement de l'agent causal afin d'identifier l'espèce de mycoplasme en cause. En raison de la multiplicité des agents causals, les méthodes de diagnostic par détection d'anticorps circulants (CFT ou ELISA) ou détection directe par PCR sont plus compliquées à mettre en œuvre. Des vaccins inactivés dirigés contre *M. agalactiae* sont utilisés dans le sud de l'Europe mais sont considérés comme peu efficaces. Un autre vaccin contenant *M. agalactiae*, *Mmc* et *Mcc* est également disponible. Il n'existe pas de test sérologique ni de vaccin pour *M. putrefaciens*.

I.2.2. Pathogénicité des membres du groupe «*mycoides*»

Mmm est le mycoplasme du groupe «*mycoides*» qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études de pathogénicité. Son génome ne contient aucun gène apparenté aux facteurs de virulence classiquement décrits chez les autres bactéries tels que des adhésines, toxines ou encore invasines (Westberg, et al., 2004). Plusieurs facteurs pourraient concourir directement ou indirectement au pouvoir pathogène de *Mmm* comme la sécrétion de métabolites secondaire oxydants, certaines protéines de surfaces ou encore la production de polysaccharides capsulaires (CPS) et d'exopolysaccharides (EPS) (Pilo, et al., 2007).

I.2.2.1. La sécrétion d' H_2O_2

La production d' H_2O_2 chez *Mmm*, induite par le métabolisme du glycérol, a été démontrée responsable de cytotoxicité *in vitro* et donc, potentiellement *in vivo*, de la stimulation d'un phénomène inflammatoire (Pilo, et al., 2005). Le système consiste en un ABC transporteur liant l'ATP (GtsABC) et en une glycérol-phosphate oxydase membranaire (GlpO). *Mmm*, après oxydation du glycérol, libère du H_2O_2 dans le milieu extracellulaire. Des cellules d'épithélium nasal embryonnaire de veau, incubées avec des concentrations

physiologiques en glycérol, meurent rapidement après infection avec *Mmm* et ce processus est inhibé par l'ajout d'anticorps monoclonaux anti-GlpO (Pilo, *et al.*, 2005). Ces résultats amènent à considérer cette enzyme comme potentiel facteur de virulence de *Mmm* (Pilo, *et al.*, 2007). Néanmoins, comme montré sur la **Figure I.6**, un tel mécanisme nécessiterait une étape préalable d'attachement du mycoplasme aux cellules hôtes afin d'injecter les métabolites toxiques (Pilo, *et al.*, 2005) et aucune recherche n'a encore prouvé ce fait. Par ailleurs, ce mécanisme ne peut pas expliquer à lui seul tous les aspects de la virulence de *Mmm*. En effet, la souche vaccinale T1/44, dont la virulence est fortement atténuée sans pour autant être absente, produit également de l' H_2O_2 et les résultats des tests de cytotoxicité ne diffèrent pas significativement de ceux des souches africaines hautement pathogènes (Bischof, *et al.*, 2008). Par ailleurs, dans cette même étude, la souche PG1 qui produit de l' H_2O_2 est cytotoxique alors qu'elle est strictement avirulente *in vivo*. En outre, ce mécanisme de transport du glycérol n'est pas propre à *Mmm*. De nombreux autres mycoplasmes ont la capacité de produire du H_2O_2 comme par exemple *Mmc* ou encore *M. penetrans* (Kannan & Baseman, 2000, Shahram, *et al.*, 2009).

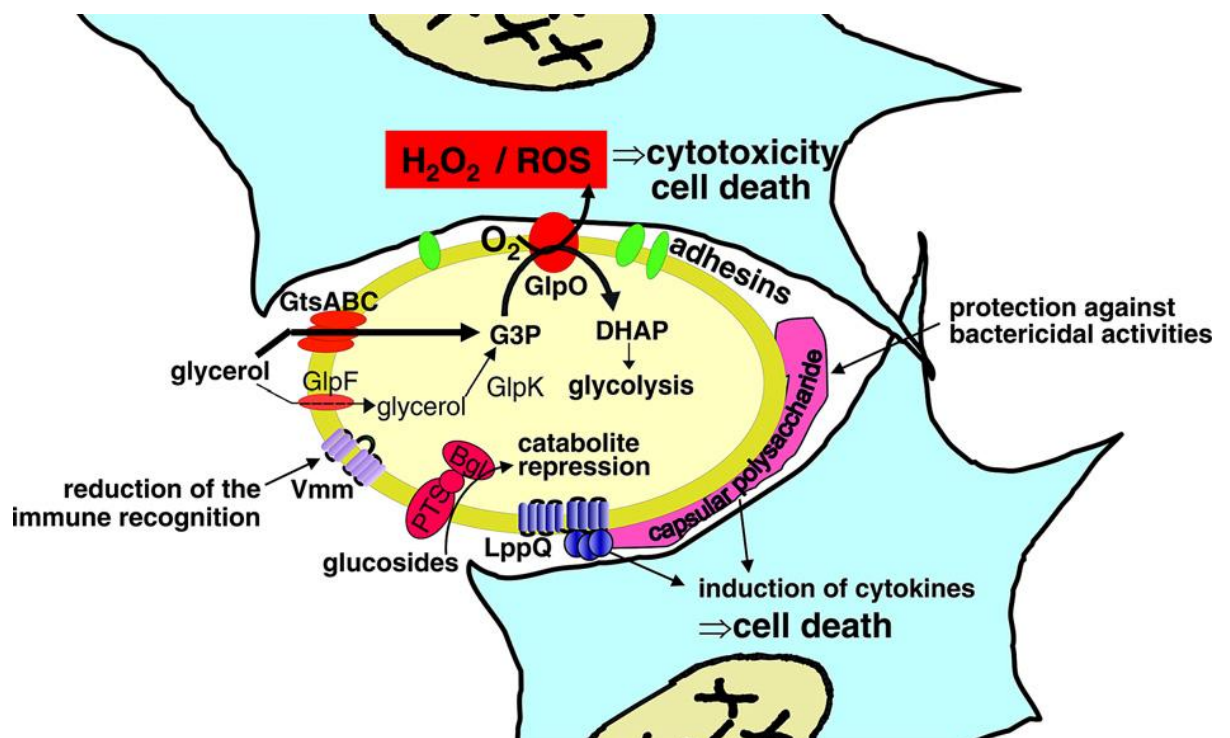


Figure I.6 : Représentation schématique des potentiels mécanismes de virulence de *Mmm* (Pilo, *et al.*, 2007).

La possible implication de GlpO dans la virulence a été investiguée en évaluant la protection induite par un vaccin contenant cette protéine sous forme recombinante, en émulsion dans de l'adjuvant de Freund (**Mulongo, et al., 2013**). Une importante réponse anticorps anti-GlpO a été obtenue mais cependant aucune protection n'a été observée lors du test d'épreuve. Au contraire, les bovins immunisés ont présenté des signes cliniques plus importants que ceux observés sur le lot contrôle.

1.2.2.2. Les lipoprotéines

De manière générale chez les Mollicutes, les lipoprotéines représentent une large proportion des protéines membranaires totales. Elles sont connues pour leur haute antigénicité. Le génome de *Mmm* dispose de 56 gènes prédits comme codant une lipoprotéine contre 86 pour *Mmc*. Chez *Mmc*, les séquences de ces gènes présentent une grande hétérogénéité d'une souche à une autre alors qu'elles sont très homogènes chez *Mmm* (**Thiaucourt, et al., 2011**).

Dans les conditions de culture usuelles, des analyses par spectrométrie de masse LC-MS/MS ont permis de détecter 18 et 30 lipoprotéines exprimées respectivement chez *Mmm* et *Mmc* (**Thiaucourt, et al., 2011**). La capacité à stimuler des cellules du système immunitaire a été évaluée pour quatre lipoprotéines : LppA, LppB, LppC et LppQ (**Dedieu, et al., 2010**). Seule LppQ semble spécifique de *Mmm* (**Vilei, et al., 2000, Pilo, et al., 2003, Pilo, et al., 2007**) et a servi de base à l'élaboration d'un test de sérodiagnostic par ELISA (**Abdo, et al., 2000, Bruderer, et al., 2002**). L'élaboration d'un vaccin avec cette protéine n'a pas mis en évidence d'effet protecteur mais, *a contrario*, induirait une exacerbation des signes de la PPCB (**Dedieu-Engelmann, 2008**).

Finalement, peu d'études à ce jour rendent compte de la virulence potentielle des lipoprotéines chez *Mmm*. Chez d'autres mycoplasmes, elles sont soupçonnées d'être impliquées dans la capacité d'adhésion aux tissus et cellules de l'hôte ainsi que dans d'autres fonctions liées à la virulence comme la stimulation de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (**Herbelin, et al., 1994, Brenner, et al., 1997, Belloy, et al., 2003**).

1.2.2.3. Les variations antigéniques

Les mycoplasmes ont développé des mécanismes sophistiqués offrant un dynamisme architectural adaptatif de la membrane plasmique. Des protéines membranaires sont soumises à des oscillations de phase ON/OFF et/ou des variations de taille aléatoires à très haute fréquence (**Citti, et al.**, 2010). Ces mécanismes d'oscillations, en modulant la mosaïque antigénique membranaire, contribuent à l'échappement au système immunitaire de l'hôte et au maintien des populations mycoplasmaïques dans l'organisme (**Citti, et al.**, 1997, **Sachse, et al.**, 2000, **Denison, et al.**, 2005). Ces protéines interviennent également dans l'adhésion ou le transport membranaire (**Theiss & Wise**, 1997, **Sachse, et al.**, 2000). Les mécanismes génétiques à l'origine de ces oscillations sont variés et décrits avec précision dans plusieurs revues (**Citti & Rosengarten**, 1997, **Citti, et al.**, 2010). Contrairement à d'autres mycoplasmes pathogènes de ruminants tels que *M. bovis* ou *M. agalactiae*, ces mécanismes semblent beaucoup moins généralisés chez *Mmm* pour lequel deux types de variations sont décrits.

Le premier mécanisme concerne une famille de protéines de surface nommées Vmm qui entraînent une réponse humorale chez l'hôte (**Hamsten, et al.**, 2008). Leur variation est induite au moment de la transcription par ajout ou délétion de nucléotides impactant sur la taille finale de la protéine (**Persson, et al.**, 2002). Des gènes analogues de ceux codant les Vmm ont été identifiés chez les autres membres du groupe «mycoïdes» et *M. putrefaciens* (**Persson, et al.**, 2002). L'expression des produits de ces gènes ainsi que le phénomène de variation de phase est caractérisé pour les Vmc de *Mcc* (**Wise, et al.**, 2006).

Le second mécanisme, découvert lors d'immunodétections sur colonies avec des anticorps monoclonaux (Mab 3F3), s'adresse à la perméase MSC_0860 appartenant à un système phosphotransférase du glucose (PtsG) (**Gaurivaud, et al.**, 2004). La variabilité est de type « switch ON/OFF » (**Fig. I.7**). La substitution d'une base en position 622 de la séquence ADN interrompt la traduction, conduisant à l'expression d'une protéine tronquée non-fonctionnelle (non détecté par le Mab 3F3) ou de la perméase intègre et fonctionnelle (détectée par le Mab 3F3). Son rôle dans la pathogénicité de *Mmm* demeure non élucidé.

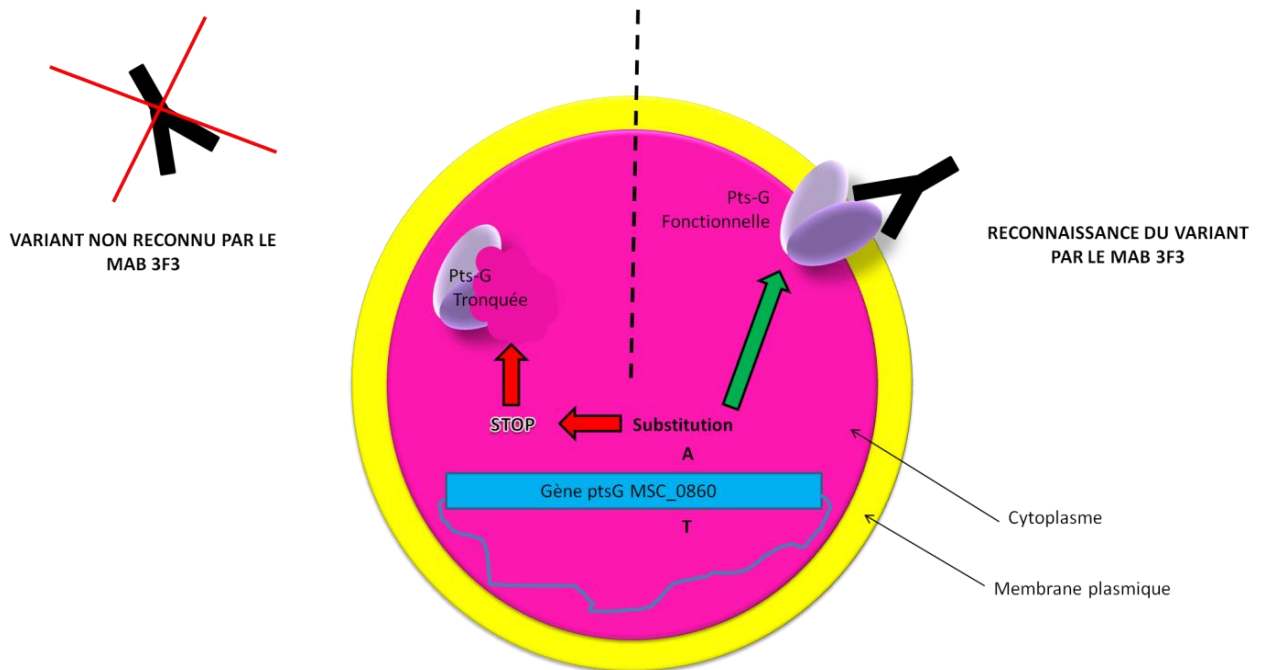


Figure I.7 : Schématisation du mécanisme de variation du gène MSC_0860 codant la Pts-G.

La présence de la perméase est prouvée par la fixation d'un anticorps monoclonal spécifique (Mab 3F3) dont l'épitope, caractérisé, se situe en aval de la zone de substitution sur le gène (**Gaurivaud, et al., 2004**).

1.2.2.4. Les polysaccharides

Mmm synthétise du matériel polysaccharidique qui a fait l'objet de nombreuses études dans le passé. Il produit un CPS composé de β -(1-6) galactofuranose et un EPS sécrété sous forme libre dans le milieu extérieur détecté *in vitro* et *in vivo* (**Plackett, 1963, Plackett & Buttery, 1964**). Ces molécules, classiquement décrites comme facteur de virulence bactérien, vont particulièrement nous intéresser au cours de cette étude et une synthèse bibliographique leur est consacrée dans la suite de cette introduction.

II. Les polysaccharides bactériens et leur biosynthèse

II.1. Les polysaccharides bactériens

En 1861, alors qu'il étudiait le processus de fermentation alcoolique du vin, Louis Pasteur marque la première découverte d'un polymère d'origine bactérienne : le dextran (**Pasteur**, 1861). Dix-sept ans plus tard, Van Tieghem identifiait la bactérie productrice de ce polysaccharide impliqué dans la vinification : *Leuconostoc mesenteroides* (**Van Tieghem**, 1878). Cette avancée novatrice sera suivie en 1886 par la découverte de la cellulose issue d'une production bactérienne (**Brown**, 1886). De nos jours, de nombreux polysaccharides bactériens sont identifiés et constituent des molécules clés tant dans les transformations de produits alimentaires en agronomie, que dans les percées scientifiques en santé humaine et vétérinaire. Dans ce manuscrit de thèse, nous allons plus particulièrement nous intéresser aux polysaccharides bactériens en tant que facteurs de virulence.

II.1.1. Composition

Les polysaccharides possèdent un squelette osidique pouvant compter d'une dizaine à plusieurs milliers de sucres. Lorsque le nombre de résidus est inférieur à 10, le composé se nomme alors oligosaccharide. Ces macromolécules, produits du métabolisme secondaire, sont d'une grande diversité. Tout d'abord, un sucre peut présenter deux formes d'énantiomères (L ou D). Les bactéries utilisent préférentiellement les oses de configuration D mais il existe de rares exceptions (**Shimizu, et al.**, 2012). Un ose peut par ailleurs posséder deux niveaux de cyclisation (pyrannose ou furannose) et deux formes anomériques (α ou β). (**Fig. I.8**). L'enchainement en oses peut présenter une composition plus ou moins complexe que ce soit dans la composition en monosaccharides ou leurs branchements (linéaires ou ramifiées). Cette composition peut éventuellement être diversifiée par des substituants organiques ou inorganiques, tels que des acides aminés, des sulfates ou encore des phosphates, greffés sur les sucres. Les liaisons osidiques vont conférer la conformation stérique de la molécule en formant des « zig-zag », des hélices ou encore des cycles.

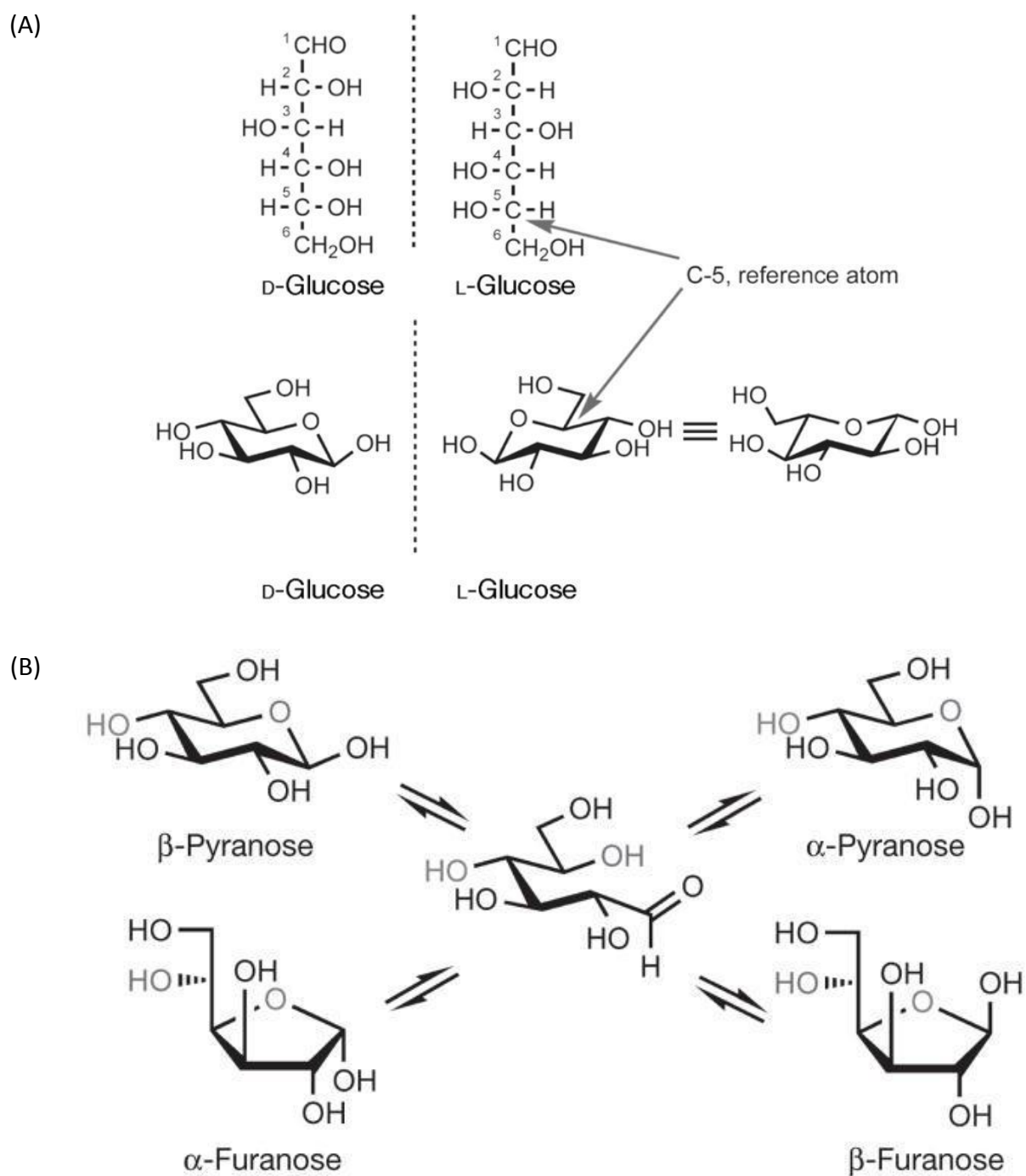


Figure I.8 : Exemple du glucose. (A) Les énantiomères D- et L-glucopyranose. (B) Les formes de cyclisation et d'anomères avec les α et β glucofuranose ou glucopyranose (Bertozi, 2009)

II.1.2. Classification selon la composition chimique

La grande diversité de composition et de structure des polysaccharides évoquée précédemment permet difficilement d'établir une classification de ces molécules complexes. Néanmoins, dès 1972, Sutherland propose une classification établie selon la nature de leurs composants (**Sutherland**, 1972). Deux classes sont alors définies : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides.

II.1.2.1. *Les homopolysaccharides*

Chez les bactéries, les homopolysaccharides ne sont composés que de monosaccharides neutres identiques (glucose, fructose ou galactose). Ils se divisent en quatre groupes selon le résidu impliqué dans la composition : les α -D-glucanes, les β -D-glucanes, les fructanes et les polygalactanes composés respectivement d' α -glucose, de β -glucose, de fructose et de galactose (**Rehm**, 2010).

II.1.2.2. *Les hétéropolysaccharides :*

Les hétéropolysaccharides regroupent des polymères dont l'unité répétitive comporte deux à sept résidus osidiques différents. Leur composition, beaucoup plus diversifiée que celle des homopolysaccharides, inclue des oses neutres (D-glucose, D-galactose, L-rhamnose), acides (acide glucuronique, acide galacturonique, etc) ou encore aminés (N-acétyl-D-glucosamine, N-acétyl-D-galactosamine). Ils sont par ailleurs fréquemment sujets à des additions de substituants organiques (exemples : acides aminés, pyruvate) ou inorganiques (exemples : sulfate, phosphate) qui leur confèrent des propriétés physiques et biologiques supplémentaires et augmentent leur diversité.

II.1.3. Classification selon la localisation

Les bactéries sont capables de synthétiser des polysaccharides intracellulaires de type glycogène, un polymère de glucose, faisant office de réserve nutritive (**Rehm, 2010**). Néanmoins, notre intérêt va se porter sur les polysaccharides bactériens extracellulaires. Ces derniers peuvent être exposés à la surface de la cellule de manière plus ou moins lâche ou être libérés dans le milieu. Ils sont classés en trois groupes (**Fig. I.9**) :

- Les polysaccharides structuraux ou pariétaux
- Les polysaccharides capsulaires (CPS)
- Les exopolysaccharides (EPS) ou « slime »

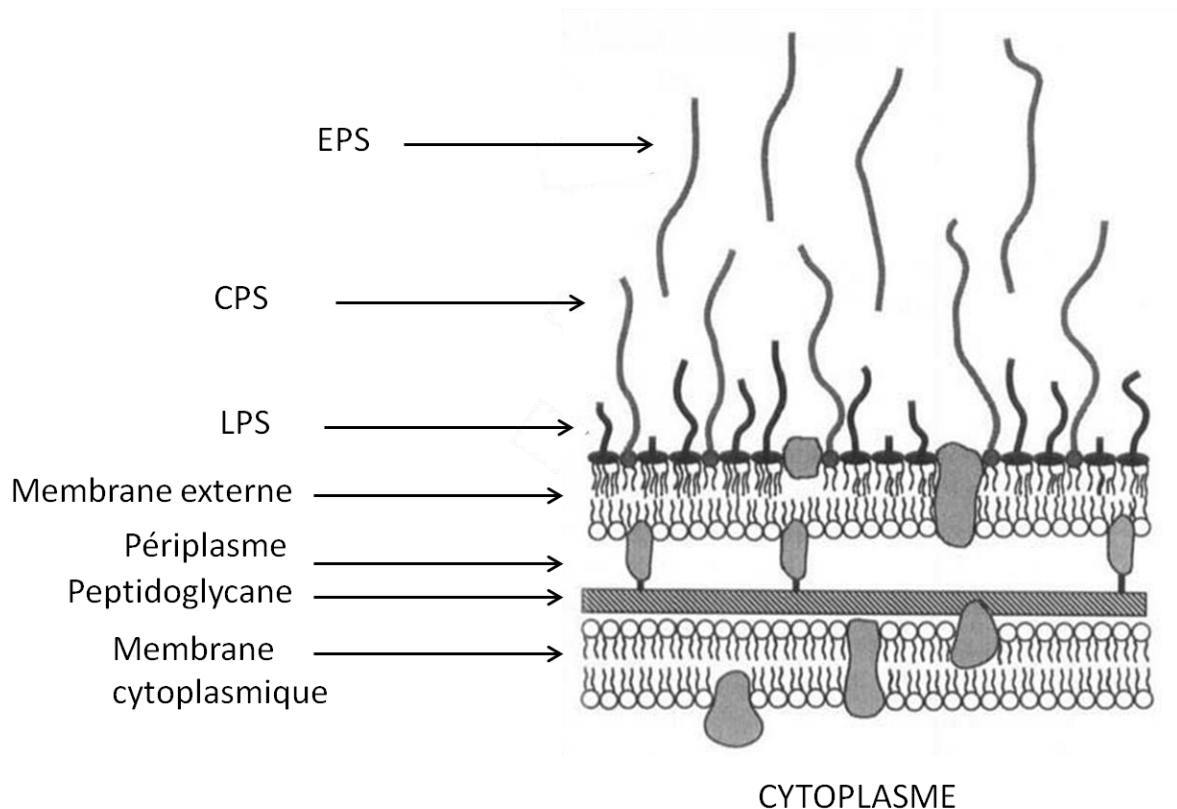


Figure I.9 : Schématisation de l'architecture de surface d'une bactérie à Gram négatif.

Le peptidoglycane et les LPS font partie des polysaccharides dits structuraux. LPS : lipopolysaccharides, CPS : polysaccharides capsulaires et EPS : exopolysaccharides (**Whitfield & Valvano, 1993**).

II.1.3.1. Polysaccharides structuraux ou pariétaux

La surface externe des bactéries est une structure complexe relativement riche en molécules glucidiques. Selon leur nature, ces éléments structuraux peuvent se diviser en plusieurs classes.

Les peptidoglycanes

Les bactéries sensibles à la coloration de Gram présentent des peptidoglycanes formés d'un squelette polysaccharidique linéaire d'acides N-acétylmuramiques et N-acétylglucosamines liés entre eux par des liaisons β -1,4 (**Figures I.10 et I.11**). Les groupements carboxyle du premier type de résidu constituent le point d'ancrage des chaînes latérales tétrapeptidiques dont la séquence est variable d'une bactérie à une autre. Cet ensemble est communément dénommé « paroi bactérienne ».

Les acides téichoïques

Typiques des bactéries à Gram positif (**Fig. I.10**), les acides téichoïques ou lipo-téichoïques, lorsqu'ils sont ancrés dans la membrane, sont des polymères de glycérophosphate (liés en 1,2 ou 1,3) ou de ribitol-phosphate (liés en 1,5) ou encore de molécules plus complexes à base de glycérol ou ribitol complétées par des sucres neutres ou acétylés (glucose, galactose, N-acétylglucosamine). Les acides (lipo-)téichoïques lient la membrane plasmique au peptidoglycane assurant ainsi la cohésion de la cellule.

Les lipopolysaccharides

Les bactéries à Gram négatif possèdent, en plus de la membrane cytoplasmique, une membrane dite externe dans laquelle s'ancrent les lipopolysaccharides (LPS) par leur partie lipidique (**Fig. I.11**). Ces LPS constituent des éléments uniques et caractéristiques de la paroi externe de ces bactéries. Ils sont formés de trois parties. La partie la plus interne, nommée « lipide A », se compose de chaînes d'acides gras reliées par un dimère de β (1-6) glucosamine phosphatées. Sa composition varie peu. Le lipide A sert de point d'ancrage dans la membrane et est responsable des activités toxiques.

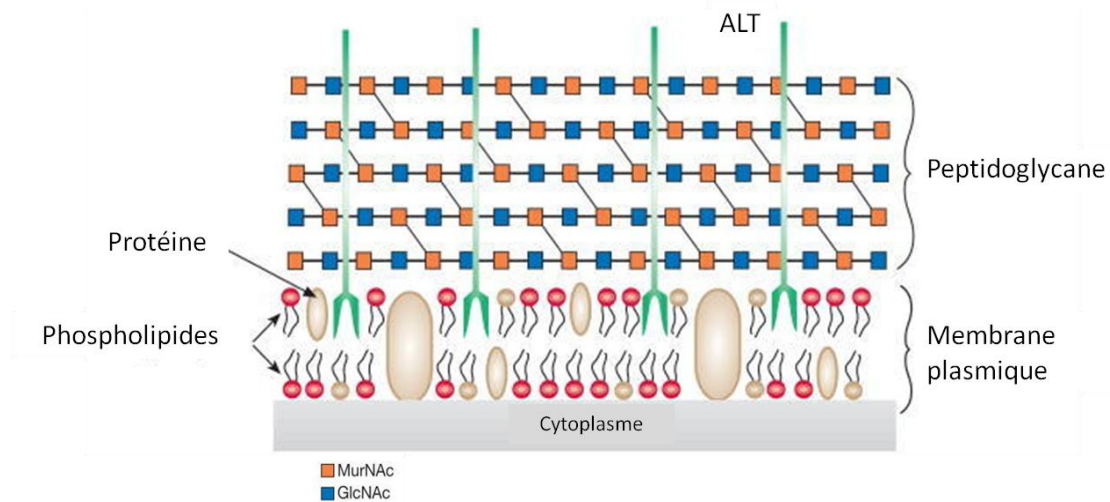


Figure I.10 : Représentation schématique de l'organisation de la membrane d'une bactérie à Gram positif.

Les bactéries à Gram positif présentent une paroi de peptidoglycane, co-polymère de *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) et d'acide *N*-acetylmuramique (MurNAc), très épaisse dont la structure est maintenue par les acides lipo-téichoïques (ALT) ancrés dans la membrane plasmique. (Esko, 2009) (lipides en rouge : phosphatidylethanolamine; lipides en rose : phosphatidylglycerol)

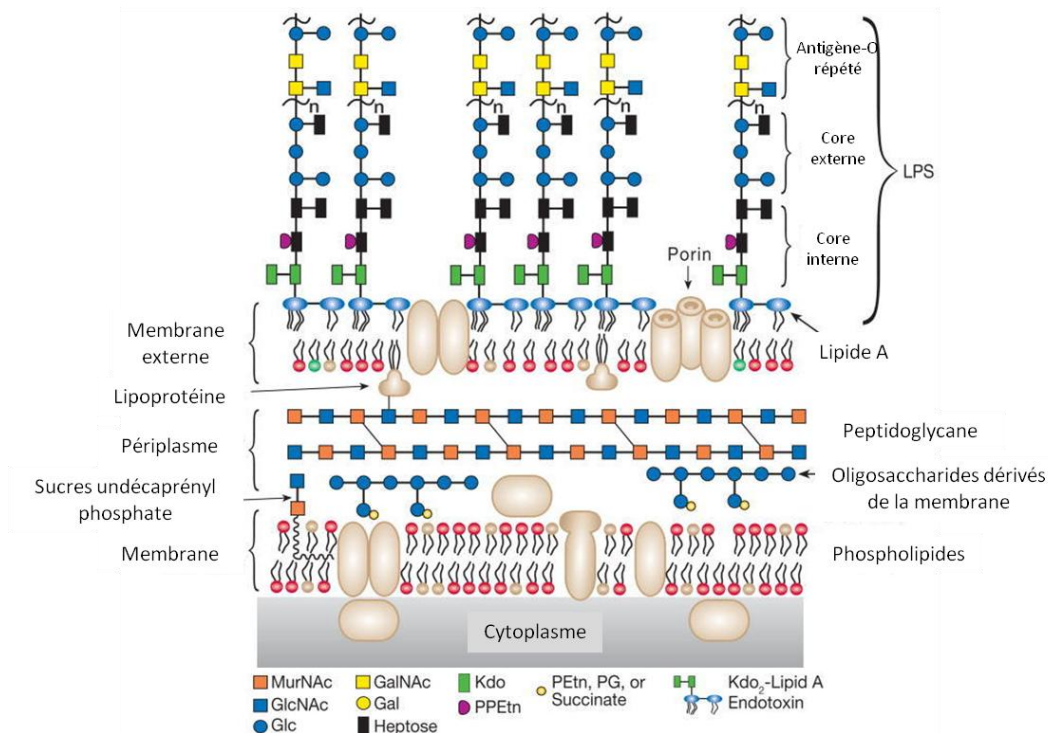


Figure I.11 : Représentation schématique de l'organisation de la membrane d'une bactérie à Gram négatif.

Les lipopolysaccharides (LPS) sont nombreux et ancrés dans la membrane externe. Le peptidoglycane, plus fin que chez les bactéries à gram positif est contenu dans le périplasme. (Esko, 2009) (Lipides en rouge : phosphatidylethanolamine; lipides en rose : phosphatidylglycerol ; GlcNAc : *N*-acetyl-D-glucosamine ; MurNAc : acide *N*-acetylmuramique ; GalNAc : *N*-acetyl-D-galactosamine ; Glc : glucose ; Gal : galactose ; Kdo : acide 3-deoxy-D-manno-octulosonique ; heptose : L-glycero-D-manno-heptose ; (n) nombre variable de répétition d'antigène-O ; PPEtn pyrophosphoethanolamine)

Une chaîne osidique centrale de composition variable ou « core » connecte de façon covalente le lipide A et une seconde chaîne osidique facultative dite « Antigène-O » (Ag-O), exposée à la surface de la cellule. Cette chaîne osidique est très variable et directement impliquée dans la spécificité antigénique de la bactérie. Par ailleurs, elle est essentiellement constituée d'oses neutres type hexoses ou heptoses.

Les lipoglycanes ou glycolipides

Lipoglycane (LPG) est le nom donné aux polysaccharides structuraux des Mollicutes afin de les distinguer des LPS des bactéries à Gram négatif. En effet, ces molécules glycolipidiques se différencient des LPS de par leur structure mais également leur activité biologique lorsque cette dernière est connue (**Smith**, 1984, **Chambaud**, *et al.*, 1999). Les LPG se composent de glycosyldiacylglycérol : une molécule de glycérol sur laquelle sont liées d'une part deux molécules d'acides gras à longue chaîne aliphatique de type hexadécanoïque ou octadécanoïque servant d'ancrage dans la membrane plasmique et, d'autre part, une partie oligosaccharidique (environ 5 résidus) exposée à la surface cellulaire (**Mayberry**, *et al.*, 1976). Des lipoglycanes sont également recensés chez des bactéries à Gram positif telles que les mycobactéries (**Pitarque**, *et al.*, 2008).

II.1.3.2. Polysaccharides capsulaires

Les polysaccharides capsulaires (CPS) constituent l'enveloppe la plus externe et forment une structure bien définie autour des bactéries. Leur composition et les enchaînements des sucres sont souvent propres à un genre voire à une espèce bactérienne. A titre d'exemple, pas moins de 80 sérotypes capsulaires sont recensés pour *E. coli* (**Whitfield**, 2006). Les bactéries dotées d'une capsule donnent naissance à des colonies d'aspect muqueux. Les CPS peuvent être dotés d'une ancre lipidique comme démontré chez *E. coli*, *Neisseria meningitidis* ou encore des streptocoques du groupe B (**Gotschlich**, *et al.*, 1981, **Jann & Jann**, 1987, **Whitfield & Valvano**, 1993, **Deng**, *et al.*, 2000). Ils se greffent covalamment en couches successives aux chaînes osidiques exposées à la surface membranaire afin de former la capsule. Des polysaccharides pariétaux peuvent entrer dans la composition de cette structure ou encore servir à son maintien autour de la cellule (**Jann & Jann**, 1987).

II.1.3.3. Les exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) sont sécrétés dans le milieu extracellulaire. La limite de distinction avec les CPS est souvent très floue dans la pratique mais ils se différencient de ces derniers par la mise en jeu de liaisons faibles de type hydrogènes et électrostatiques, non covalentes. Ils peuvent être séparés des cellules par simple centrifugation contrairement aux CPS (**Whitfield**, 1988, **Branda**, *et al.*, 2005). Ils forment le plus souvent un réseau complexe et visqueux (« slime » en anglais) autour des bactéries engendrant des structures en agrégats. La plus décrite de ces structures est le biofilm : il s'agit d'une matrice de biopolymères hautement hydratés contenant une colonie bactérienne en interface solide-liquide (**Flemming & Wingender**, 2010). Les EPS sont les éléments majeurs de cette matrice qui se compose par ailleurs d'eau, de protéines (enzymes), d'ADN ou encore d'agents surfactants.

II.2. Les polysaccharides en tant que facteurs de virulence

La production de CPS et d'EPS est fréquente chez les bactéries pathogènes. De nombreuses fonctions leur sont assignées et ce à tous les stades du processus infectieux (**Wilkinson**, 1958, **Bazaka**, *et al.*, 2011, **Reckseidler-Zenteno**, 2012).

La capsule confère une résistance à la dessiccation ce qui assure de meilleures conditions de survie pour les bactéries dans le milieu extérieur et facilite leur transmission d'un hôte à un autre. Ophir et Gutnick ont démontré que des isolats « muqueux » d'*E. coli*, d'*Erwinia stewartii* et d'*Acinetobacter calcoaceticus* étaient plus résistants à la dessiccation que leurs souches isogéniques « non muqueuses » avec, respectivement, 35% et 0,7 à 5% de survie (**Ophir & Gutnick**, 1994).

Les EPS, notamment dans les structures en biofilm, permettent l'adhésion des bactéries entre elles ou aux tissus de l'hôte tout en formant une matrice isolante. De ce fait, ils assurent un rôle de barrière protectrice et sélective en laissant passer les nutriments et en excluant les molécules antimicrobiennes comme certains antibiotiques ou désinfectants (**Xue**, *et al.*, 2013). C'est le cas de la souche multirésistante de *Staphylococcus aureus*, à l'origine d'infections nosocomiales graves, qui se multiplie en biofilm (**Brady**, *et al.*, 2011).

Les bactéries peuvent ainsi se multiplier afin de persister et de coloniser les tissus de l'hôte et également procéder à des échanges de matériel génétique de part leur proximité (**Wolcott, et al.**, 2013). De plus, concernant la résistance à des agents bactéricides, il a été démontré chez trois pathogènes humains que les CPS, en contact avec des peptides antimicrobiens, se détacheraient de la bactérie sous forme d'EPS sous l'effet d'une altération des charges de surface, protégeant ainsi les agents pathogènes des effets de ces molécules (**Llobet, et al.**, 2008).

Par ailleurs, les LPS et les CPS sont impliqués dans la résistance au système immunitaire de l'hôte que ce soit dans la réponse innée ou adaptative. Par exemple, les CPS de méningocoques du groupe B procurent une résistance à l'action du complément et à la phagocytose par opsonisation, notamment en masquant les structures bactériennes de surface qui pourraient l'activer ou par mimétisme de composants polysaccharidiques de l'hôte (**Howard & Glynn**, 1971, **Jann & Jann**, 1987). *A contrario*, des CPS sont capables d'induire une inflammation et une activation du complément aberrantes causant de lourds dommages tissulaires pour l'hôte (**Moxon & Kroll**, 1990).

II.3. Biosynthèse des polysaccharides

La biosynthèse des polysaccharides requiert des transporteurs de sucres et des enzymes impliqués dans le métabolisme carboné de la bactérie. Une fois le sucre importé dans le cytoplasme puis modifié, d'autres enzymes, propres à l'élaboration du polymère, entrent en jeu dans « l'activation » du sucre, par greffage d'un nucléoside tri-phosphate, assurant ainsi sa prise en charge par des enzymes de polymérisation et les protéines d'export.

II.3.1. Transport des sucres

Trois systèmes actifs majeurs d'importation des sucres sont recensés chez les bactéries. Le premier est le système phosphotransférase (PTS) dépendant du phosphoénolpyruvate (PEP). Il consiste en une translocation du substrat osidique avec phosphorylation de différents intermédiaires afin de transférer le phosphate du PEP jusqu'au sucre. Deux composantes cytoplasmiques sont dénombrées : l'enzyme I et

l'histidine phosphoprotéine (HPr) commune à tous les PTS. Au niveau membranaire, une perméase EII, spécifique d'un sucre, assure le transport et la phosphorylation concomitante du substrat (**Postma, et al.**, 1993). La perméase se compose de trois domaines : IIA, IIB et IIC, portés ou non par la même chaîne polypeptidique.

Le second type de transport est un système ATP-binding cassette ou transporteur ABC organisé, de manière générale, en un domaine transmembranaire (TMD) et un domaine cytoplasmique conservé qui lie l'ATP ou nucleotide binding domain (NBD) (**Konings, et al.**, 1994). Le TMD est variable en fonction du substrat qu'il reconnaît.

Le troisième est un système perméase utilisant la force protomotrice, soit l'hydrolyse d'ATP couplée à une sortie de protons de la cellule. Ce système correspond à des kinases indépendantes qui vont phosphoryler le sucre lors de son entrée dans la cellule.

Enfin, des systèmes ne nécessitant pas d'énergie pour la diffusion des sucres à travers la membrane existent et sont appelés facilitateurs (**Deutscher, et al.**, 2006).

II.3.2. Modifications enzymatiques et activation du monosaccharide importé

Les bactéries sont capables d'importer une multitude de sucres, à titre d'exemple, *Streptococcus pneumoniae* pourrait importer 32 sucres différents (**Bidossi, et al.**, 2012). Néanmoins, le glucose est la source carbonée énergétique pour la majorité des bactéries. Il est de ce fait le monosaccharide le plus importé et les microorganismes disposent d'enzymes permettant sa dérivation en d'autres sucres telles que des épimérases ou des isomérases. Afin d'être pris en charge par les enzymes de synthèse, le sucre doit être activé sous la forme d'un donneur de haute énergie. Lorsque le glucose est importé, un résidu phosphate est greffé sur le C6. A partir de ce moment, soit ce dernier est pris en charge par les enzymes glycolytiques et il sera alors isomérisé en fructose-6-phosphate, soit il est pré-activé par isomérisation en précurseur glucose-1-phosphate (G1P) par une phosphoglucomutase (**Singh, et al.**, 2012). Un nucléoside triphosphate, les plus communs étant l'uridine triphosphate (UTP) ou le guanosine triphosphate (GTP), est ensuite échangé avec le phosphate du G1P par une transférase (**Fig I.12A**). L'UDP-glucose peut éventuellement être

converti en UDP-galactose par une UDP-glucose-4-épipimérase avant d'être pris en charge par les enzymes de polymérisation (**Fig I.12B**).

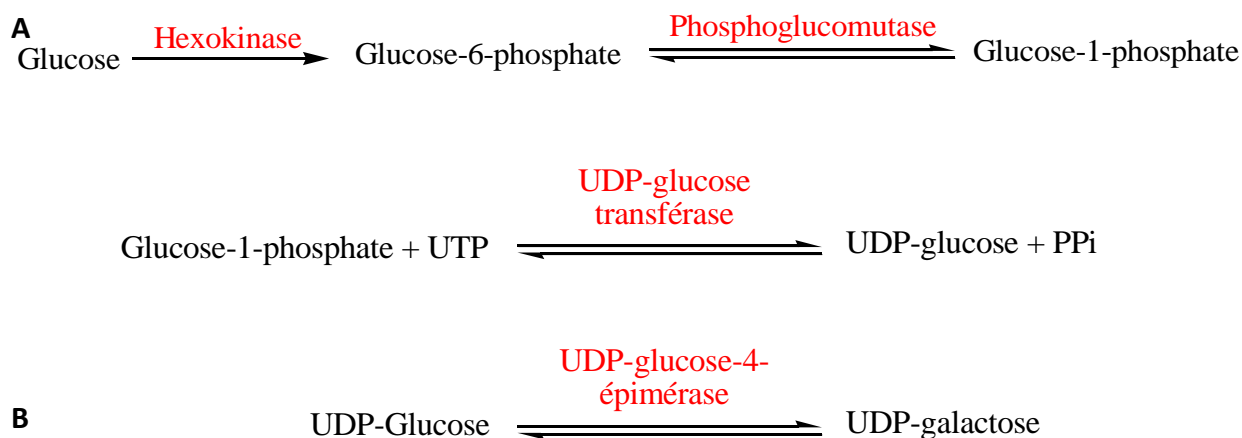


Figure I.12 : Schématisation des réactions enzymatiques d'activation du glucose en nucléoside sucre (A) et exemple de modification enzymatique de l'UDP-Glucose par épimérisation (B).

II.3.3. Polymérisation

La synthèse des oligosaccharides et polysaccharides est assurée majoritairement par des glycosyltransférases (GT), une grande famille enzymatique et, plus rarement, par des glycoside hydrolases (GH) (**Cantarel, et al., 2009**). Les GT sont aussi appelées enzymes de Leloir, en l'honneur de Luis F. Leloir qui fut récompensé par le prix Nobel de chimie en 1970 pour la découverte des nucléosides sucres. La base de données [CAZy](#) les classe en 94 familles, chiffre en perpétuelle croissance car de nouvelles fonctions sont régulièrement découvertes (**Cantarel, et al., 2009**). Ces enzymes sont présentes chez les procaryotes et les eucaryotes animaux ou végétaux et possèdent une très haute spécificité pour leurs substrats. La plupart des GT transfèrent le groupement saccharidique d'un nucléotide-sucré (le donneur) sur une molécule spécifique dite accepteur, donnant naissance à une liaison glycosidique et à la formation processive d'un polymère de haut poids moléculaire (**Fig I.13**). Elles prennent aussi en charge les liaisons entre un lipide ou une autre molécule acceptrice (protéine) avec un sucre activé. Les GT peuvent être divisées en plusieurs sous-unités catalytiques et sont le plus souvent situées dans le cytoplasme en association avec une protéine de translocation dédiée à l'export du composé. La synthèse du polymère est cytosolique. Néanmoins, dans le cas des exopolysaccharides, les sous-unités pré-assemblées

dans la cellule peuvent être exportées afin d'être polymérisées par des enzymes extracellulaires.



Figure I.13 : Schématisation de la réaction enzymatique d'une glycosyltransférase

II.3.4. L'export du polymère

Le mécanisme d'export est intimement lié à la polymérisation. Il existe trois stratégies d'export des polysaccharides décrites à ce jour (**Figure I.14**) : le système Wzx/Wzy dépendant, les transporteurs ABC dépendants et le système synthase dépendant (**Cuthbertson, et al., 2010**).

Le système Wzx/Wzy dépendant consiste en une translocase ou « flippase » (Wzx), un transporteur putatif dont le mécanisme est inconnu à ce jour, et une polymérase Wzy. Wzx exporte les unités répétées du polymère synthétisé du cytoplasme à une molécule acceptrice en surface de la bactérie où la polymérisation se poursuit par ajout de nouvelles unités répétitives. La réaction de polymérisation est ensuite assurée par la protéine Wzy.

Dans les systèmes de transporteurs ABC dépendants, la polymérisation s'effectue dans le cytoplasme par ajouts de monomères sur l'extrémité non-réduite d'un intermédiaire glucidique lié à un accepteur. L'ABC transporteur prend en charge l'export une fois la polymérisation finie.

Dans le système synthase dépendant, l'enzyme de polymérisation est également responsable de l'export du polysaccharide. La présence d'un accepteur dans ce cas dépend du polysaccharide en question (**Whitney & Howell, 2013**).

Pour les bactéries à gram négatif, les polysaccharides restent dans l'espace périplasmique ou sont pris en charge par d'autres transporteurs afin de traverser la

membrane externe. L'accepteur peut être de nature variée : un lipide, un LPS, une protéine. Après la polymérisation et l'export, le polymère demeurera lié à son accepteur ou sera libéré dans le milieu extracellulaire. Pour les systèmes nécessitant un accepteur, l'absence de ce dernier bloque l'élongation de la partie osidique.

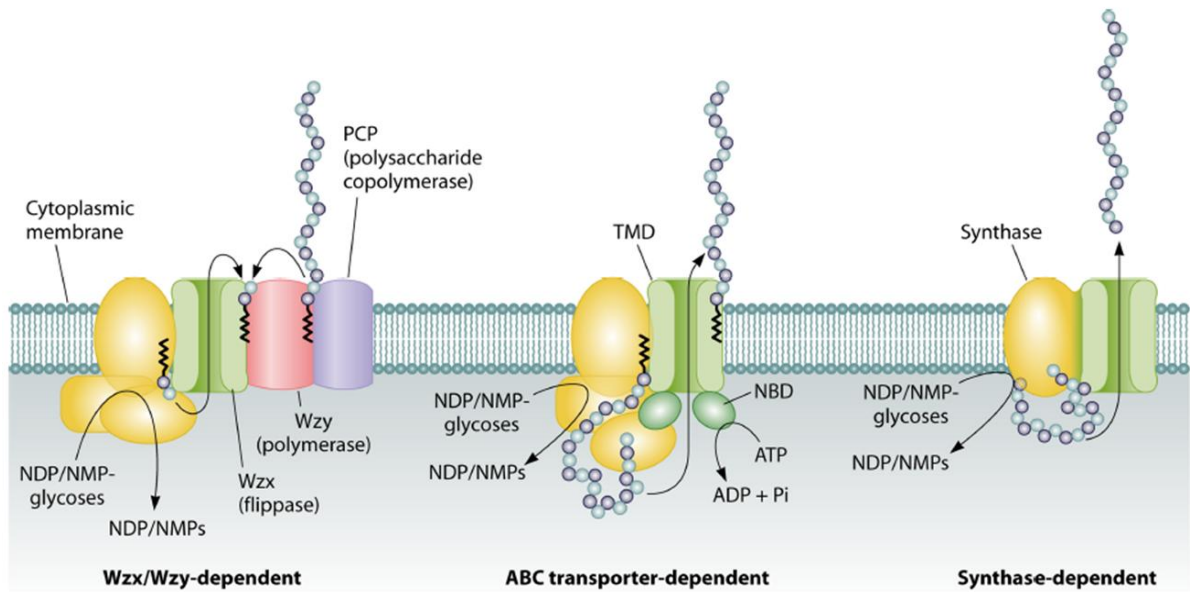


Figure I.14 : Modèles des processus impliqués dans l'export des polysaccharides (Cuthbertson, *et al.*, 2010).

(NDP : Nucléotide Di-Phosphate, NMP : Nucléotide Mono-Phosphate, TMD : Domaine transmembranaire, ATP : Adenosine Tri-Phosphate, ADP : Adénosine Tri-Phosphate, NBD : Domaine liant l'ATP)

III. Les polysaccharides de mycoplasmes

III.1. Généralités

Du fait de l'absence de paroi, les membranes plasmiques des mycoplasmes ont fait l'objet de nombreuses études structurales et biologiques. Une grande variété de glycolipides est recensée chez ces organismes lors de l'examen de la composition lipidique de leur membrane (**Smith**, 1984). Dans sa revue, Smith insiste sur le caractère chimique différant de celui des LPS et propose de désigner ces glycolipides en tant que LPG.

La première piste relatant de leur existence date de 1937 avec les travaux de Kurotchkin sur *Mmm* (**Kurotchkin**, 1937) à l'origine de nombreuses recherches sur la caractérisation et la fonction de ce polymère. Aujourd'hui, de nombreux mycoplasmes sont connus pour leur capacité à sécréter des polysaccharides tels que *M. dispar* (**Howard & Gourley**, 1974), *M. gallisepticum* (**Tajima, et al.**, 1982), *M. penetrans* (**Neyrolles, et al.**, 1998) ou encore *M. bovis* (**Brooks, et al.**, 2004).

De manière générale, les mécanismes de l'implication des polysaccharides dans la pathogénicité sont encore méconnus et leur fonction était de prime abord attribuée au maintien de la structure cellulaire (**Howard & Gourley**, 1974). En 1992, Almeida et ses collaborateurs montrent que les CPS de *M. dispar* concourent à la résistance à la phagocytose par les macrophages alvéolaires (**Almeida, et al.**, 1992). Actuellement, les progrès réalisés dans le domaine du séquençage haut débit, les techniques de mutagenèse ou encore de caractérisation chimiques des polysaccharides ouvrent la voie à une meilleure compréhension de leur rôle dans les interactions hôtes-pathogènes (**Reid, et al.**, 2010). A titre d'exemple, l'isolement d'un mutant du pathogène murin *M. pulmonis* déficient dans la production d'un polysaccharide dit « EPS-I » constitue une avancée notable dans le décryptage du rôle des polysaccharides chez les mycoplasmes (**Shaw, et al.**, 2013). En effet, l'EPS-I de ce mycoplasme est un CPS qui induit un échappement aux macrophages de l'hôte ainsi qu'une résistance au complément (**Bolland & Dybvig**, 2012, **Bolland, et al.**, 2012). L'isolement du mutant déficient dans la production de ce CPS a de plus permis de découvrir un second polymère dit « EPS-II » impliqué dans la formation de biofilm (Daubenspeck, et

al., 2009). Les tests *in vivo* et *in vitro* démontrent que l'EPS-II intervient dans l'adhésion et la colonisation par les bactéries du tractus respiratoire des souris (**Simmons & Dybvig**, 2009).

III.2. Les polysaccharides découverts chez les mycoplasmes du groupe

«*mycoides*»

III.2.1. Le galactane de *Mmm*

III.2.1.1. Découverte et caractérisation

En 1937, une substance sérologiquement active, donnant une réaction négative en biuret et positive en Molish (respectivement tests de détection de protéines et de sucres), est détectée dans les cultures de *Mmm* mais aussi dans les poumons et le sérum de bovins atteint de PPCB. Ces observations suggèrent la présence d'un carbohydrate hapténique (**Kurotchkin**, 1937). En 1960, une équipe australienne isole la molécule de culots de mycoplasmes issus de culture *in vitro* par une méthode d'extraction de LPS et la caractérise chimiquement. Les études chimiques révèlent la présence d'un galactane composé de D-galactose en conformation furannose dont les sous-unités sont liées en β -(1-6) (**Fig. I.15**) (**Buttery & Plackett**, 1960, **Plackett & Buttery**, 1964). Elles ont également permis de détecter de faibles quantités de glucose (1 % de l'extrait de galactane) et une fraction lipidique (4% de l'extrait) composée de glycérol et d'acide gras insaturés. Aucune expérience ne décrit clairement la taille du polymère de galactane. Néanmoins, il est question d'une molécule de poids moléculaire supérieur à 100kDa dont la taille des fragments isolés est hétérogène (**Buttery & Plackett**, 1960). Le galactane est extrait en grande quantité des culots de mycoplasmes lavés. Il représente 10% de la masse sèche de la bactérie. Grâce à des observations par microscopie électronique après coloration au rouge de ruthénium de l'échantillon, il apparaît que le polysaccharide exposé à la surface de *Mmm* forme une capsule bien définie (**Fig. I.16**) qui serait à l'origine des filaments distingués à l'œil nu dans les cultures (**Gourlay & Thrower**, 1968).

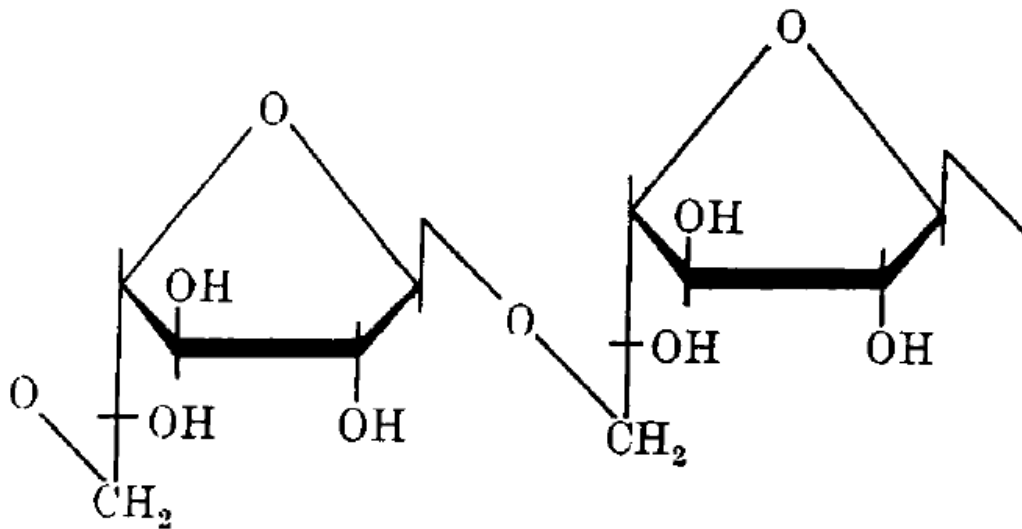


Figure I.15 : Structure moléculaire d'un disaccharide de galactofuranose liés en β -(1-6), constituant du galactane (Smith, 1984)

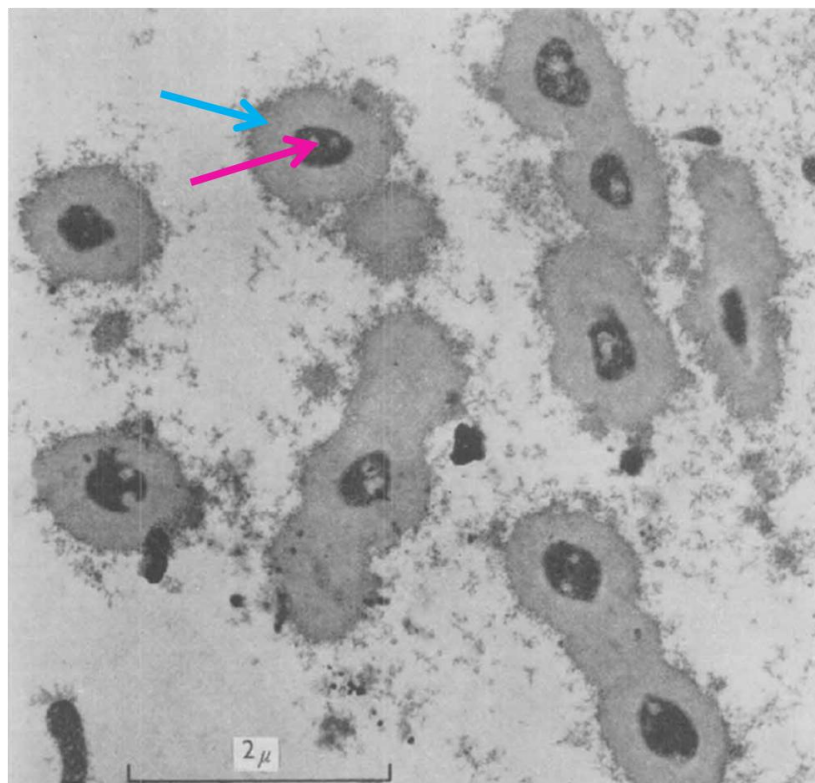


Figure I.16 : Observation par microscopie électronique d'une section de mycoplasmes isolés d'un filament de culture et immergés dans un antisérum x 14 700 (Gourlay & Thrower, 1968)

La flèche rose désigne le mycoplasme et la flèche verte la capsule polysaccharidique.

III.2.1.2. *Implication du galactane dans la virulence de Mmm*

La souche avirulente KH3J ne présente pas de matériel capsulaire à sa surface (**Howard & Gourley**, 1974) ce qui pose la question du lien potentiel entre le galactane et la virulence de *Mmm*. Le galactane extrait des cellules mycoplasmaïques se révèle être pyrogénique chez le lapin lorsqu'il est injecté en intraveineuse (**Villemot**, 1962). De plus, les travaux de Kurotchkin (**Kurotchkin**, 1937) ainsi que de White (**White**, 1958) suggèrent la présence d'un autre polysaccharide retrouvé sous forme libre dans les fluides (sérum, plasma, urine ou encore liquide pleural) d'animaux atteints de PPCB. Le composé en question est d'ailleurs analysé par Gourlay en 1962, après extraction du polymère à partir de l'urine d'un animal infecté (**Gourlay**, 1962). Cet antigène est un carbohydrate hapténique qui n'induit pas de production d'anticorps chez le lapin quand il est injecté pur même s'il est pyrogénique. Il a la capacité de fixer le complément. Lors d'une conférence, Plackett confirme que ces composés se retrouvent dans les surnageants de culture mais que la complexité du milieu empêche toute analyse chimique (**Plackett**, 1963) néanmoins les articles postérieurs traitent de galactane « F » (Free : libre). Plusieurs études sont menées afin de décrypter le potentiel rôle du galactane dans la pathogénicité de l'agent de la PPCB. Certaines lui attribuent une implication dans des réactions allergiques de type immédiates du fait de communautés antigéniques avec le pneumogalactane bovin (**Shifrine & Gourlay**, 1965a, **Shifrine & Gourlay**, 1965b, **Gourlay & Shifrine**, 1966), et d'autres une capacité à prolonger la mycoplasmémie et à entraîner des lésions articulaires et rénales (**Hudson, et al.**, 1967, **Lloyd, et al.**, 1971). De plus, dans l'hypothèse que le polysaccharide sécrété sous forme libre soit du galactane, Hudson postule qu'il capterait les anticorps circulants dirigés contre *Mmm* (**Hudson, et al.**, 1967). A ce jour, les polysaccharides « libres » de *Mmm* demeurent non caractérisés et les mécanismes exacts impliquant le galactane capsulaire et les EPS de *Mmm* dans la virulence restent inconnus.

III.2.2. Les polysaccharides des autres membres du groupe «mycoides»

L'équipe australienne à l'origine de la caractérisation du galactane de *Mmm* a également mené des études sur l'autre pathogène bovin du groupe «mycoides» : *M. leachii* (souche N29), qui produirait un polymère de β -(1,2) glucose et également un polysaccharide libre détecté dans les surnageants de culture et le sang des bovins infectés (**Plackett**, 1963). Cependant, cette étude est restée sans suite. Un polysaccharide est identifié chez *Mmc*

sérovar « capri » (souche PG3). Les études chimiques montrent qu'il s'agit d'un polymère de glucose de structure non déterminée représentant 0,5% de la masse du mycoplasme (Jones, *et al.*, 1965). Des analyses de microscopie électronique confirment l'existence d'un LPG mais ne mettent pas en évidence de structure en capsule (Schiefer, *et al.*, 1975). Rurangirwa identifie chez *Mccp* un polysaccharide complexe de structure indéterminée et composé d'oses neutres (glucose, galactose, mannose et fucose) et acétylés (N-acétyl-D-glucosamine et N-acétyl-D-galactosamine) lors d'extraction réalisées sur les culots de mycoplasmes et les surnageants de culture (Rurangirwa, *et al.*, 1987a). Ce polysaccharide sous forme LPG ou EPS est reconnu par un anticorps monoclonal et les tests d'inhibition de croissance procédés avec ce dernier montrent une spécificité vis-à-vis de *Mccp* (Rurangirwa, *et al.*, 1995).

III.2.3. Les polysaccharides du groupe «mycoides» dans le diagnostic

L'antigénicité des polysaccharides, extraits de *Mmm* ou présents dans l'urine des animaux infectés, avait été noté précocement puisque Gourlay avait pu montrer qu'ils étaient capables de fixer le complément (Gourlay, 1962). Peu de temps après, le galactane était utilisé pour sensibiliser des globules rouges fixés par le formol pour préparer un antigène d'hémagglutination passive (Provost, 1964). Les hématies formolées étaient parfaitement stables et pouvaient être lyophilisées. Cependant ce test ne permettait pas de détecter les porteurs chroniques ni certains animaux en phase aiguë, phénomènes qui étaient aussi observés dans la réaction de fixation du complément. Comme ces deux techniques détectent principalement des IgM, l'absence de détection de certains cas aigus a pu être expliquée par la présence de galactane circulant qui piégerait les anticorps, et l'absence de détection des animaux dans la phase chronique par la disparition rapide des IgM au profit des autres immunoglobulines. Une technique similaire a pu être développée pour la détection de foyers de PPCC avec un test d'agglutination avec des billes sensibilisées avec un polysaccharide extrait de cultures de *Mccp* (Rurangirwa, *et al.*, 1987b). Les billes de latex offrent l'avantage d'une plus grande reproductibilité. Ultérieurement des tests similaires d'agglutination avec des billes sensibilisées avec des polysaccharides de *Mccp* et *MmmSC* ont été testés (March, *et al.*, 2000, March, *et al.*, 2003) et ces tests sont maintenant commercialisés par le VLA Weybridge sous la dénomination de BoviLat et CapriLat.

IV. Objectifs de recherche

Les objectifs de travail s'inscrivaient dans une thématique de recherche commune à l'ANSES et au CIRAD : les mycoplasmoses dues aux mycoplasmes du groupe «mycoides».

Comme pour l'ensemble des Mollicutes, les mécanismes du pouvoir pathogène des membres de ce groupe restent très mal connus. Chez *Mmm*, l'agent de la PPCB, depuis longtemps les polysaccharides capsulaires (CPS) et libres (EPS) sont suspectés de jouer un rôle majeur dans la virulence. D'autres mycoplasmes du groupe «mycoides» sont également capables de produire des EPS détectés dans le sang des animaux infectés. Une meilleure connaissance de ces molécules et de leur rôle permettrait probablement d'ouvrir de nouvelles voies en matière de diagnostics, surveillance et de vaccins sachant que les moyens de lutte, tests de dépistage et vaccination restent encore aujourd'hui très perfectibles pour cette maladie. Mais l'étude des EPS et de leurs actions était fortement entravée jusqu'à présent par la difficulté de les obtenir dépourvues de contaminants provenant du milieu de culture.

Mes principaux objectifs étaient de caractériser les EPS produits par les membres du groupe «mycoides» et d'élargir les connaissances sur les voies de biosynthèse de ces polymères par le biais d'approches *in silico* et de génomique fonctionnelle. La caractérisation chimique des EPS a fait l'objet d'une collaboration avec le laboratoire des polysaccharides microbiens et végétaux (LPMV) renommé récemment unité de biologie des plantes et innovation de l'IUT d'Amiens.

Avant toute chose, il était impératif de mettre au point une technique de production et d'extraction de ces EPS permettant un affranchissement des contaminations induites par les milieux complexes de culture des mycoplasmes. Afin de paramétrer des conditions optimales, nous avons choisi un « mycoplasme modèle ». Notre choix s'est porté naturellement sur *Mmm*. En effet, *Mmm* est responsable d'une maladie très grave des bovins. De plus, la production d'EPS et leur implication dans la pathogénicité, pour cette bactérie, semblent évidents d'après les études dont elle a fait l'objet. Par ailleurs, les génomes de différentes souches sont séquencés, annotés et disponibles dans la base de données Molligen (<http://services.cbib.u-bordeaux2.fr/molligen/>) et, de plus, une banque de

mutants d'une souche hautement pathogène est disponible et caractérisée au CIRAD. L'étude a ensuite été étendue à l'ensemble du groupe «mycoides».

Dans le **CHAPITRE II** de ce travail sont présentés un article et des résultats complémentaires. L'article porte d'une part, sur le développement de la technique de production et sur la caractérisation des EPS de *Mmm* et, d'autre part, sur une étude comparative, complétée par des analyses *in silico*, de variants intraclonaux de *Mmm* présentant des colonies d'opacité différentes. Les résultats complémentaires traitent de la recherche d'un mutant déficient dans la production de polysaccharides au sein de la banque de mutants de la souche 8740.

Le **CHAPITRE III**, sous forme d'article (version provisoire), porte sur la caractérisation des EPS de l'ensemble des membres du groupe «mycoides» ainsi que sur les analyses *in silico* des voies de biosynthèse.

Enfin, la conclusion générale ainsi que les perspectives de ces travaux de thèse sont détaillées dans le **CHAPITRE IV**.



CHAPITRE II

ETUDE DES EXOPOLYSACCHARIDES SECRETES PAR *MYCOPLASMA MYCOIDES* SUBSP. *MYCOIDES*

I. Résumé

La péripneumonie contagieuse bovine est une maladie respiratoire sévère affectant les bovins et dont l'agent responsable est *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. En l'absence des déterminants classiques de virulence, la pathogénicité de *Mmm* est suspectée d'être liée à des fonctions métaboliques intrinsèques et à des composants spécifiques présents à la surface externe des cellules. Un de ces composants, le polysaccharide capsulaire ou galactane s'est révélé jouer un rôle dans la persistance et la dissémination de *Mmm*. Les exopolysaccharides libres (EPS), produits par *Mmm* et retrouvés dans la circulation sanguine des bovins infectés, ont fait l'objet de peu d'études depuis leur mise en évidence. En effet, leur caractérisation avait été freinée par la présence de polysaccharides contaminants provenant des milieux de cultures complexes.

L'article porte sur le développement d'une méthode pour produire d'importantes quantités d'EPS par transfert des mycoplasmes de leur milieu complexe dans un milieu chimiquement défini, puis par l'extraction des EPS. Nous avons par ailleurs analysé des variants intraclonaux de *Mmm* produisant des colonies opaques ou translucides sur agar et suspectés de présenter des oscillations en lien avec la production de polysaccharides. Enfin, nous avons mené des analyses *in silico* sur les potentielles voies de biosynthèse des polysaccharides de *Mmm*.

L'identification de gènes candidats responsables de la synthèse des polysaccharides de *Mmm* nous a conduits à rechercher un mutant déficient dans la production du polymère dans une banque existante et caractérisée. Cette étude est traitée dans la partie résultats complémentaires de ce chapitre.

II. Article-1 : Caractérisation des exopolysaccharides libres sécrétés par *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*

L'article est présenté sous sa forme publiée. Les figures supplémentaires (notées **Fig. S1 et S2**) sont disponibles dans les annexes (**ANNEXES II**).

Characterization of Free Exopolysaccharides Secreted by *Mycoplasma mycoides* Subsp. *mycoides*

Clothilde Bertin^{1,2,✉ab}, Corinne Pau-Roblot³, Josiane Courtois³, Lucía Manso-Silván^{4,5}, François Thiaucourt^{4,5}, Florence Tardy^{1,2}, Dominique Le Grand^{2,1}, François Poumarat^{1,2}, Patrice Gaurivaud^{1,2*}

¹ Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Lyon, France, ² Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Marcy-L'étoile, France, ³ Unité Biologie des Plantes et Innovation, EA 3900, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France, ⁴ Centre International de Recherche en Agronomie pour le Développement, UMR CMAEE, Montpellier, France, ⁵ Institut National de Recherche Agronomique, UMR1309 CMAEE, Montpellier, France

Abstract

Contagious bovine pleuropneumonia is a severe respiratory disease of cattle that is caused by a bacterium of the *Mycoplasma* genus, namely *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (Mmm). In the absence of classical virulence determinants, the pathogenicity of Mmm is thought to rely on intrinsic metabolic functions and specific components of the outer cell surface. One of these latter, the capsular polysaccharide galactan has been notably demonstrated to play a role in Mmm persistence and dissemination. The free exopolysaccharides (EPS), also produced by Mmm and shown to circulate in the blood stream of infected cattle, have received little attention so far. Indeed, their characterization has been hindered by the presence of polysaccharide contaminants in the complex mycoplasma culture medium. In this study, we developed a method to produce large quantities of EPS by transfer of mycoplasma cells from their complex broth to a chemically defined medium and subsequent purification. NMR analyses revealed that the purified, free EPS had an identical $\beta(1-6)$ -galactofuranosyl structure to that of capsular galactan. We then analyzed intracolonial Mmm variants that produce opaque/translucent colonies on agar. First, we demonstrated that colony opacity was related to the production of a capsule, as observed by electron microscopy. We then compared the EPS extracts and showed that the non-capsulated, translucent colony variants produced higher amounts of free EPS than the capsulated, opaque colony variants. This phenotypic variation was associated with an antigenic variation of a specific glucose phosphotransferase permease. Finally, we conducted in silico analyses of candidate polysaccharide biosynthetic pathways in order to decipher the potential link between glucose phosphotransferase permease activity and attachment/release of galactan. The co-existence of variants producing alternative forms of galactan (capsular versus free extracellular galactan) and associated with an antigenic switch constitutes a finely tuned mechanism that may be involved in virulence.

Citation: Bertin C, Pau-Roblot C, Courtois J, Manso-Silván L, Thiaucourt F, et al. (2013) Characterization of Free Exopolysaccharides Secreted by *Mycoplasma mycoides* Subsp. *mycoides*. PLoS ONE 8(7): e68373. doi:10.1371/journal.pone.0068373

Editor: Mitchell F. Balish, Miami University, United States of America

Received: March 19, 2013; **Accepted:** May 29, 2013; **Published:** July 15, 2013

Copyright: © 2013 Bertin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: patrice.gaurivaud@anses.fr

✉a Current address: Centre International de Recherche en Agronomie pour le Développement, UMR CMAEE, Montpellier, France

✉b Current address: Institut National de Recherche Agronomique, UMR1309 CMAEE, Montpellier, France

Introduction

Bacteria of the *Mycoplasma* genus have evolved from their Gram-positive ancestors by massive reduction of their genome size. They are considered the smallest and simplest self-replicating organisms, with many missing biosynthetic pathways and the notable absence of a cell wall [1]. Despite this apparent simplicity, mycoplasmas are able to develop metabolic responses and adaptations similar to those of more complex bacteria, due notably to their higher proportion of multifunctional enzymes [2]. Several mycoplasma species are known to cause important diseases in humans and animals. Members of the so-called *Mycoplasma mycoides* cluster are particularly deleterious for ruminants and are responsible for severe economic losses worldwide. *Mycoplasma* (M.) *mycoides* subsp. *mycoides* (Mmm) is the causal agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP), a highly contagious respiratory disease notifiable to the World Organization for Animal Health

(Office International des Epizooties, OIE). CBPP was formerly one of the major cattle diseases worldwide and has now been eradicated from many countries, although it persists in Africa. Under natural conditions, CBPP affects only the *Bos* genus, producing pathognomonic clinical lesions confined to the thoracic cavity [3]. Contrary to other mycoplasmas involved in cattle respiratory diseases, such as *M. bovis* [4], Mmm is not considered an agent of co-infection and is often isolated on its own. This clinical picture contrasts with that observed in infections by *M. mycoides* subsp. *capri*, its closest phylogenetic neighbor and one of the agents of contagious agalactia, a small-ruminant syndrome affecting diverse organs (udder, joints, eyes, lungs).

None of the usual virulence determinants described for other bacteria, such as toxins, invasins or cytotoxins, has been identified in the currently sequenced Mmm genomes [5,6]. However, several

mechanisms have been proposed to account for Mmm pathogenicity such as adherence to the host tissues, immune evasion, persistence, dissemination, inflammation and cytotoxicity [7]. The polysaccharides have been often implicated in the pathogenesis of bacteria colonizing the lung [8] and have attracted attention for decades as a potential Mmm virulence factor. Mmm has been shown to produce two types of polysaccharides: a capsular one, namely galactan, identified [9] and chemically characterized [10] by Buttery and Plackett in the 1960s, and an extracellular one, hereafter named exopolysaccharide (EPS) as defined by Branda and collaborators [11]. The purification of free EPS has been jeopardized by polysaccharide contaminants in the complex culture medium used to grow mycoplasmas. EPS is immunologically related to the capsular galactan and has been found in large amounts as a free Mmm product unassociated with cells, both in culture supernatants and in the blood of infected cattle [12]. Mmm strains able to produce large amounts of capsular polysaccharide proved less sensitive to growth inhibition by bovine antisera [13] and displayed longer bacteremia than strains with little capsular polysaccharide in a mouse infection model [14]. This clearly pointed towards a role of capsular polysaccharides in Mmm persistence and dissemination. Antigenic cross-reactivity between Mmm capsular galactan and the pneumogalactan isolated from bovine lung was proposed to be at the origin of autoimmune reactions [15] and thus to participate in the inflammation process. In addition, intravenous injection of free, extracellular EPS induced specific effects on the vascular system of the lung and respiratory system of cattle [16] and promoted persistent bacteremia in calves, when it preceded inoculation of an Mmm strain [17,18].

The present study was conducted to elucidate the composition and structure of the EPS produced by Mmm and to compare it with the capsular galactan. We developed a purification method consisting of transferring mycoplasma cells from their complex growth medium to a chemically defined medium to minimize polysaccharide contamination. Two strains were used: (i) the type strain PG1^T, for which the complete genome sequence is available [5], and (ii) the field strain Afadé, highly virulent and already used for biofilm formation [19] and virulence studies [20], as it causes CBPP under natural and experimental conditions [21]. EPS purified from the supernatant of Mmm strain Afadé proved to have the same composition and structure as capsular galactan and was also recognized by CBPP-convalescent bovine serum. Furthermore, the production of capsular versus free galactan was associated with variations in colony opacity related to an antigenic switch of a specific glucose permease. In silico analyses were conducted in order to decipher the metabolic pathways that might account for the production of either capsular galactan or free EPS by the corresponding opaque and translucent variants.

Materials and Methods

1. Strains, Variant Selection and Growth Conditions

Two strains were used in this study: Mmm Afadé (From the CIRAD collection, isolated from cattle in Chad in 1968), used for EPS purification and for selection of opaque (OP) and translucent (TR) colony variants and PG1^T (type strain, NCTC 10114), used for electron microscopy and for in silico analysis of galactan biosynthetic pathways. Both strains were grown at 37°C under 5% CO₂ in PPLO-based medium (DIFCO) supplemented as described previously [22]. The chemically defined CMRL-1066 medium (Invitrogen), supplemented with amoxicillin 2 g/L (GlaxoSmithKline), was used for exopolysaccharide production. OP and TR colony variants of strain Afadé were selected on

PPLO agar medium and sub-cultured to check their homogeneity. They were also grown on 30 mg/ml Congo red plates to visualize any extracellular material. OP and TR colonies were analyzed by colony blotting as described previously [23]. In brief, the monoclonal antibody 3F3 [24] was used to detect TR colonies, while OP colonies were counterstained with Ponceau red. The proportion of each variant was estimated by colony counting after blot staining.

2. EPS Production and Purification

Fifty mL of PPLO-based medium were inoculated with 500 mL of mycoplasma culture in stationary phase and incubated for 2 days at 37°C in 5% CO₂. Mycoplasma cell density was estimated by cell enumeration using the most probable number method [25]. Cells were harvested by centrifugation at 12000 g for 45 min at 20°C, washed once with 20 mL sterile PBS (10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4) and finally suspended in 500 mL sterile PBS. This suspension was used to inoculate PPLO-based broth or CMRL-1066 medium with 10⁸–10¹⁰ mycoplasmas/mL. The cultures were further incubated for 72 h to 96 h. Aliquots were sampled at 24 h intervals to measure pH and cell density and to purify EPS.

EPS were purified as described by De Vuyst et al. [26], with a few modifications. Cells were removed by centrifugation (14000 g, 45 min, 4°C). A proteinase K (Promega) treatment (60 mg/mL for 4 hours at 37°C) was applied only as an extraction control from the PPLO-based medium in order to degrade serum proteins associated with EPS. Polypeptides were precipitated with 1/10 volume of cold 100% (w/v) trichloro-acetic acid (Sigma-Aldrich) at 4°C for 2 hours followed by centrifugation (14000 g, 60 min, 4°C). Polysaccharides contained in the supernatant were precipitated with 6 to 10 volumes of cold acetone at –20°C for 48 h and collected after centrifugation at 14000 g, 60 min at 4°C. The acetone was carefully removed and the pellet was air-dried and dissolved in ultra-pure sterile water. For NMR and monomer composition analysis, extracts were dialyzed against regularly-renewed ultra-pure sterile water for 48 hours at room temperature in 3.5 kDa cut-off dialysis tubing (Spectrum Laboratories).

The effect of carbon sources on EPS production by strain Afadé was studied by adding to CMRL-1066 medium, which already contains 1 g/L glucose, either (i) 4 g/L glucose, mannitol, galactose, sorbitol or sucrose before seeding or (ii) 1 g/L glucose at 24, 48 and 72 hours after seeding. Carbohydrates were prepared as 200 g/L stock solutions and sterilized by filtration (0.22 mm filter units) before addition to CMRL-1066.

3. EPS Quantification and Characterization

The concentration of total sugars was estimated by phenol/sulfuric acid method [27] using glucose as standard. For each sample, the determination was done in triplicate and results were expressed as mg of glucose/mL of CMRL-1066 mean ± standard deviation (SD). The potential presence of polypeptides in the EPS extract was assessed by silver staining of Any kD polyacrylamide gel (Bio-Rad) using the proteosilver kit from Sigma-Aldrich.

EPS was detected with a polysaccharide detection kit and immunodetected by dot blotting using a CBPP positive serum. In brief, 2 mL of the EPS extract were spotted onto a nitrocellulose membrane that was either stained with the glycoprotein detection kit from Sigma-Aldrich or treated as previously described for dot immunobinding [28].

4. Electron Microscopy

Electron microscopy was performed as previously described [29] using five-day-old colonies of Mmm strain PG1^T grown on solid PPLO-based medium. Samples were examined under a Philips CM120 transmission electron microscope operating at an accelerating voltage of 75 kV.

5. Monosaccharide Composition Determination

The monosaccharide components were determined by high-performance anion exchange chromatography (HPAEC) on a CarboPak PA 1 with a pulsed amperometric detector (Dionex ICS 3000 system). After hydrolysis of EPS (1 mg) with 4 M CF₃CO₂H (100uC, 4 h), aliquots of the extract were passed through a 4650 mm Propac PA1 pre-column (Dionex) before separation of anionic compounds on a 46250 mm Propac PA1 column (Dionex) at 30uC. Gradient elution was performed with a multi-step gradient as follows: 0–25 min, 90% H₂O and 10% NaOH 160 mM; 25–34 min, 100% NaOH 200 mM; 35–50 min 90% H₂O and 10% NaOH 160 mM at a flow rate of 1 mL/min. Peak analysis was performed using Chromeleon software, version 7.0.

6. NMR Spectroscopy

Prior to NMR analysis, samples were exchanged twice with 9.9% D₂O (Euriso-top), dried under vacuum, and dissolved in 99.96% D₂O (1 mg/0.5 mL). ¹H NMR spectra were recorded, at 80uC, on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5 mm BBI probe and Topspin 1.3 software. ¹H NMR spectra were accumulated using a 30u pulse angle, a recycle time of 1 s and an acquisition time of 2 s for a spectral width of 3 000 Hz for 32 K data points with presaturation of the HOD signal using a presaturation sequence provided by Bruker. ¹³C NMR experiments were conducted on the same spectrometer operating at 125.48 MHz with 2 s as relaxation delay. The 2D ¹H/¹H COSY, ¹H/¹H TOCSY, ¹H/¹H NOESY, H/¹³C HSQC and ¹H/¹³C HMBC spectra were acquired with standard pulse sequences delivered by Bruker.

7. In silico Analysis of Candidate Galactan Biosynthetic Pathways

Genes potentially involved in EPS biosynthetic pathways were retrieved from the molligen database [30] and from the Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy) [31]. Potential transmembrane regions were predicted by TMHMM2 [32]. Putative functions and conserved domains of proteins encoded by genes were analyzed using the profile HMM method [33,34] and PSI-LAST [35].

Results and Discussion

1. Mmm Growth and EPS Secretion in Defined Medium versus Complex Mycoplasma Broth

It had been previously shown that large amounts of polysaccharides not bound to the cells could be recovered from Mmm cultures [17,36]. However, at the time, these polysaccharides could not be purified from the complex, undefined medium used to grow mycoplasmas. In this work we developed an experimental procedure that limits the potential contamination of newly synthesized polysaccharides by saccharides from the growth medium. Mycoplasma cells were first grown to stationary phase in classic PPLO-based medium, then washed and transferred to a chemically defined, synthetic medium (CMRL-1066) for further incubation. CMRL-1066 is a constituent of the commonly used mycoplasma SP4 medium [37] and contains all the components

needed to support cellular metabolism, but not growth. Following a 72 h-incubation in CMRL-1066, polysaccharide extracts were clearly detected in culture supernatants of Mmm strain Afadé, while no polysaccharides were detected in non-inoculated CMRL-1066 used as negative control (Figure 1A). These polysaccharides were not attached to the cells and were therefore considered as EPS [11]. In contrast, polysaccharide production by Mmm could not be assessed in PPLO-based medium because of detection of a strong background in the negative control corresponding to the saccharides contained in this growth medium (Figure 1A).

EPS production in CMRL-1066 was shown to be reproducible, maximum after 72 h of incubation and related to the initial viable mycoplasma titer (Figure 2, Table 1). EPS detection proved to be difficult when CMRL-1066 was inoculated with less than 10⁸ mycoplasmas/mL. CMRL-1066 was not able to sustain mycoplasma growth and a decrease in the number of viable cells was observed during the incubation period (Figure 2, Table 1). This decrease in viability was not related to a high inoculum concentration, as it was also evidenced in several serial ten-fold dilutions of the initial culture (Table 1). The poor cholesterol concentration (0.2 mg/L) and the absence of other fatty acids in CMRL-1066 might result not only in growth inhibition but also in cell lysis, as previously suggested [38]. In turn, it can be hypothesized that this cellular decay may artificially contribute to EPS release into the culture supernatant [39]. However, no correlation was found between loss of viability and EPS production after 72 h of incubation (data not shown), suggesting that the contribution of cell lysis to EPS release was minor.

In 1972 Sutherland suggested that bacterial growth inhibition may result in a rise in EPS production due to the increased availability of EPS precursors, not used for glycolysis [40]. This was explored here by analysis of CMRL-1066 supplementation with different sugars during incubation. Regular addition of glucose (1 g/L) had no effect on mycoplasma viability but resulted in a 50% increase in EPS production (Figure 2). A similar increase of EPS production was measured when 4 g/L of glucose were added to CMRL-1066 at the beginning of incubation (Table 1). This indicated that during incubation in minimal medium unable to sustain growth, glucose was not catabolized by mycoplasmas but was used to produce EPS. Supplementation of CMRL-1066 medium, inoculated with 10⁹ mycoplasmas/mL, with other carbohydrates (mannitol, galactose, sucrose or sorbitol; 4 g/L) was also tested to measure the effect of the sugar source on EPS

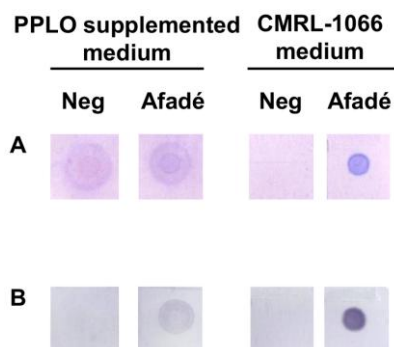


Figure 1: Exopolysaccharide (EPS) secretion by Mmm strain Afadé in supplemented PPLO broth and CMRL-1066 medium. EPS extracted either from Mmm culture (Afadé) or from unseeded medium used as negative control (Neg) were spotted onto a nylon membrane and either stained with a glycoprotein detection reagent (A) or immunodetected using a serum from a CBPP-positive bovine (B). doi:10.1371/journal.pone.0068373.g001

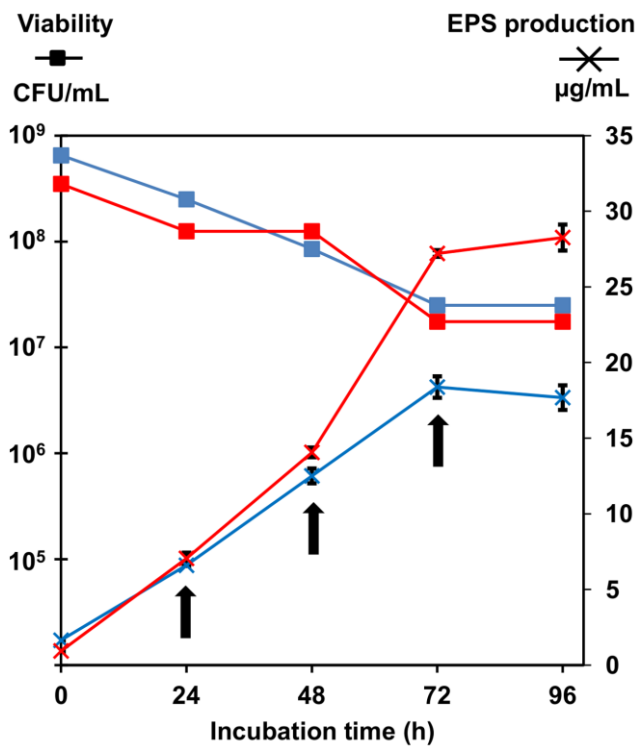


Figure 2: Kinetics of exopolysaccharides secretion and viability of Mmm strain Afadé following transfer into CMRL-1066 medium with (red) or without (blue) glucose supplementation. Glucose (1 g/L) was added at 24, 48 and 72 h (arrows). doi:10.1371/journal.pone.0068373.g002

synthesis. None of these sugars modified the viability of strain Afadé after 72 h of incubation (Table 1). As expected, the addition of sorbitol, which is not used as an energy source [41] or exploitable for EPS biosynthesis (due to absence of the required metabolic pathways) had no effect. Mannitol and sucrose supplements resulted in increased EPS production. This could be due to the more efficient transport and recycling of these two sugars into EPS, in comparison with glucose.

2. Structural Determination and Immunogenic Properties of Free EPS Secreted by Mmm

Mmm EPS was subjected to total acid hydrolysis with 4 M trifluoroacetic acid. HPAEC-PAD analysis of the acid hydrolysate revealed the presence of galactose (96.7±1.0%) and glucose (3.3±1.0%). This composition is similar to that described by Plackett et al. for the galactan Mmm capsule [36]. The structural analysis of Mmm EPS was carried out by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. The 7 resonances observed on the ¹H NMR spectrum (Figure 3A) and correlations detected on the 2D NMR COSY spectrum (Figure 3B) led us to attribute the observed chemical shifts to protons of galactosyl residues: 5.046 (H-1), 4.118 (H-2), 4.068 (H-3), 4.013 (H-4), 3.965 (H-5), 3.864 (H-6) and 3.648 (H-6'). On the 2D NMR HSQC spectrum (Figure 3C), the connectivities observed between H-1 and C-1 (109.0 ppm), H-2/C-2 (82.1 ppm), H-3/C-3 (78.0 ppm), H-4/C-4 (84.5 ppm), H-5/C-5 (70.8 ppm) and H-6,H-6'/C-6 (70.2 ppm) were characteristic of a galactan homopolymer. The ¹³C signal at 109.0 ppm and ¹H signal at 5.046 ppm were typical of D-galactose residues with a β furanose configuration [42]. Chemical shift values obtained for C-6 indicated the presence of a linkage on the C-6 in Gal residues.

The ¹H/¹H NOESY spectrum presented interesting inter-residue connectivities: H-1 of galactose (δ 5.046) was connected to two signals at δ 3.864 and 3.648 belonging to H-6 and H-6' of galactose. This correlation was confirmed on the ¹H/¹³C HMBC spectrum. Thus, these connectivities and ¹H and ¹³C chemical shifts are consistent with the literature values for a β(1→6)-galactofuranose polymer [43]. Again, the structure of the EPS released into the culture medium was identical to that of the capsular galactan [10]. Previous studies had reported galactan to be immunogenic [12]. The EPS produced in our experimental set up was also detected by serum from a CBPP-convalescent bovine (Figure 1B). This did not represent a cross-reaction due to protein contamination of the EPS extract, since no polypeptides were detected by silver staining after SDS PAGE (data not shown).

3. Correlation between EPS Production and Colony Appearance

In this study we showed that the free galactan secreted by Mmm strain Afadé presented the same monomeric composition and structure as the capsular polysaccharide previously described, which was associated with Mmm strain V5 cells [10,36]. In other bacteria the presence of a polysaccharidic capsule has often been associated with an opaque colony phenotype [29,44,45]. Variation in colony opacity has also been described in mycoplasmas (i.e. *M. pulmonis* [46] and *M. hyorhinis* [47]) but not in Mmm. However, Minga reported the existence of rough and smooth morphotypes of Mmm colonies and showed that they were related both to the capacity to produce a capsule and to pathogenicity [48]. Here we showed that both Mmm strains PG1^T and Afadé produced a mixture of opaque (OP) and translucent (TR) colonies on agar (Figure 4A). TR colonies showed the typical "fried egg" appearance, with a small opaque center surrounded by a large translucent peripheral area. In contrast, OP colonies were darker and their center was not always distinct from the peripheral area. When grown on agar plates containing Congo red, a direct dye known to interact with the extracellular matrix, OP colonies showed an intense and uniform red coloration, while TR colonies were poorly stained, with staining limited mainly to their center (Figure 4A). OP and TR variants of Mmm PG1^T were then observed by electron microscopy following staining with Ruthenium red, which binds to polysaccharides. Electron micrographs obtained from TR colonies showed separated cells with scanty extracellular material, while cells from OP colonies were aggregated and coated with a patchy, electron-dense material made of polysaccharides (Figure 4B), which appeared to attach the cells together. This cellular aggregation may account for the colony opacity, as previously suggested for *Nisseria gonorrhoeae* [49]. Interestingly, OP and TR colony variants differed in their capacity to secrete EPS, with the TR yielding three-fold more EPS than the OP variant (Table 1, Figure 5). Viability in CMRL-1066 was comparable for both colony variants, though acidification of the culture medium was more pronounced for the TR variant, indicating that glycolysis was more efficient (Figure 5). Glucose metabolism is largely dependent on the capacity to import sugars and, in a previous study, we had demonstrated that a glucose permease (MSC_0860/0873), belonging to the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system (PTS), of Mmm PG1 was regulated by a genetic ON/OFF switch that resulted in premature termination of the PTS permease and epitope variation [23]. The monoclonal antibody targeting this epitope, namely 3F3, was shown to bind to TR but not to OP colonies (Figure 6). This may suggest that truncation of the glucose PTS permease in OP variants results in less efficient glucose transport and, consequently, less efficient glycolysis and EPS synthesis.

Table 1: Exopolysaccharide secretion and viability of Mmm strain Afadé in CMRL-1066 medium at the time of inoculation (T0) and after 72 h of incubation (T72).

Strain/variant	Sugar added (4 g/L)	T0	T72	EPS
Afadé	None	4.8×10^{10}	4.0×10^8	48.8
	None	$^a(3.6+/-1.0) \times 10^9$	$^a(2.1+/-1.0) \times 10^8$	$^a25.2+/-3.0$
	None	$^a(4.9+/-0.8) \times 10^8$	$^a(8.9+/-7.0) \times 10^6$	$^a8.2+/-4.4$
	None	$^a(4.0+/-0.5) \times 10^7$	$^a(1.4+/-0.2) \times 10^5$	$^a1.0+/-0.5$
	None	4.8×10^6	4.0×10^4	0.5
	None	4.8×10^5	3.0×10^1	0.6
	None	6.5×10^9	1.7×10^6	24.0
	Glucose	6.5×10^9	2.5×10^6	31.8
	Sorbitol	6.5×10^9	6.5×10^5	27.9
	Mannitol	6.5×10^9	1.7×10^7	37.0
	Galactose	6.5×10^9	8.5×10^6	28.5
	Sucrose	6.5×10^9	4.0×10^7	37.5
TR variant	None	$^a(3.4+/-0.5) \times 10^8$	$^a(6.1+/-5.3) \times 10^6$	$^a15.4+/-1.1$
OP variant	None	$^a(6.0+/-2.0) \times 10^8$	$^a(2.7+/-0.6) \times 10^8$	$^a2.9+/-1.0$
	None	6.5×10^8	1.2×10^8	0.7
	Glucose	6.5×10^8	8.5×10^7	2.3
	Sorbitol	6.5×10^8	1.2×10^8	0.5
	Mannitol	6.5×10^8	4.0×10^5	0.9
	Galactose	6.5×10^8	2.0×10^7	0.7
	Sucrose	6.5×10^8	1.2×10^8	1.9

^aData correspond to mean +/- standard deviation of several (≥ 3) experiments

doi:10.1371/journal.pone.0068373.t001

The frequency of reversion from 3F3-negative (3F3NEG) to 3F3-positive (3F3POS) variants of strain Afadé was shown to vary from 10^{-6} to 10^{-2} [23]. In the present study, this reversion resulted in less than 0.2% of 3F3NEG (OP colony variant) in 3F3POS cells (TR colony variant) or in Mmm strain Afadé cultures, and a proportion of 1 to 5% of 3F3POS (TR colony variant) cells in 3F3NEG (OP colony variant) cultures at the time of transfer into CMRL-1066 medium. This may account for the weak EPS production obtained from the OP (3F3NEG) colony variant. We then attempted to minimize the proportion of TR (3F3POS) cells in OP (3F3NEG) cultures in order to assess EPS production by the OP colony (3F3NEG) variant cells. Several cultures were tested and the one with the lowest titer of 3F3POS (TR colony variant) cells (i.e. 0.5%) was used to inoculate CMRL-1066 medium. Under these conditions, EPS production was very low, whatever the sugar source (Table 1). However, addition of different sugars to the CMRL-1066 medium appeared to modulate the level of reversion to 3F3POS (TR colony variant) after 72 hours of incubation. Mannitol was the only carbohydrate which led to an increase of 3F3POS (TR colony variant), from 0.5% to 12%, but the EPS release was not enhanced, due to considerable cell decay. This suggests the existence of complex regulations for transport and catabolism of the different sugars.

4. In silico Analysis of Candidate Galactan Biosynthetic Pathways

We showed that TR colony variants, which were detected by 3F3 monoclonal antibody, produced free, extracellular galactan. In contrast, OP colony variants, which did not display any

reaction with the 3F3 antibody, because of a premature termination of their glucose PTS permease, produced capsular galactan. Polysaccharide biosynthesis by OP colony variants was intriguing, since truncation of the glucose PTS permease would be expected to result in an overall less efficient glucose transport and therefore hampering notably of polysaccharide synthesis.

We tried to decipher the biochemical links between glucose intake, polysaccharide chain elongation and attachment/release of the galactan by retrieving in silico all potentially involved Mmm genes. The genomes of the 2 currently sequenced Mmm strains, namely PG1^T (accession number NC_005364.2) [5] and Gladysdale (accession number CP002107.1) [6], were used.

As NMR analyses revealed that galactan is composed of galactose residues in the furanose ring form, we first looked for enzymes involved in UDP-galactofuranose synthesis, which is the usual precursor of a galactofuranose polymer. UDP-galactofuranose is usually formed from UDP-galactopyranose after the action of an UDP galactofuranose mutase Glf [50,51]. One glf gene identified in Mmm strain PG1^T [5] is also present in the Gladysdale genome. In bacteria, UDP-galactopyranose can be synthesized via two enzymes of the Leloir pathways [52], either from galactose-1-phosphate after the action of a galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GalT) or from UDP-glucose via an UDP-glucose 4-epimerase (GalE). No galT homologue was retrieved from the genomes of Mmm, indicating that galactose is not a source for galactan synthesis. This is concordant with our experiment showing that galactose was unable to enhance galactan synthesis (Table 1). In contrast the glucose-dependent synthetic pathway is highly probable since two genes were identified in both genomes, one of which encodes for UDP-glucose 4-epimerase

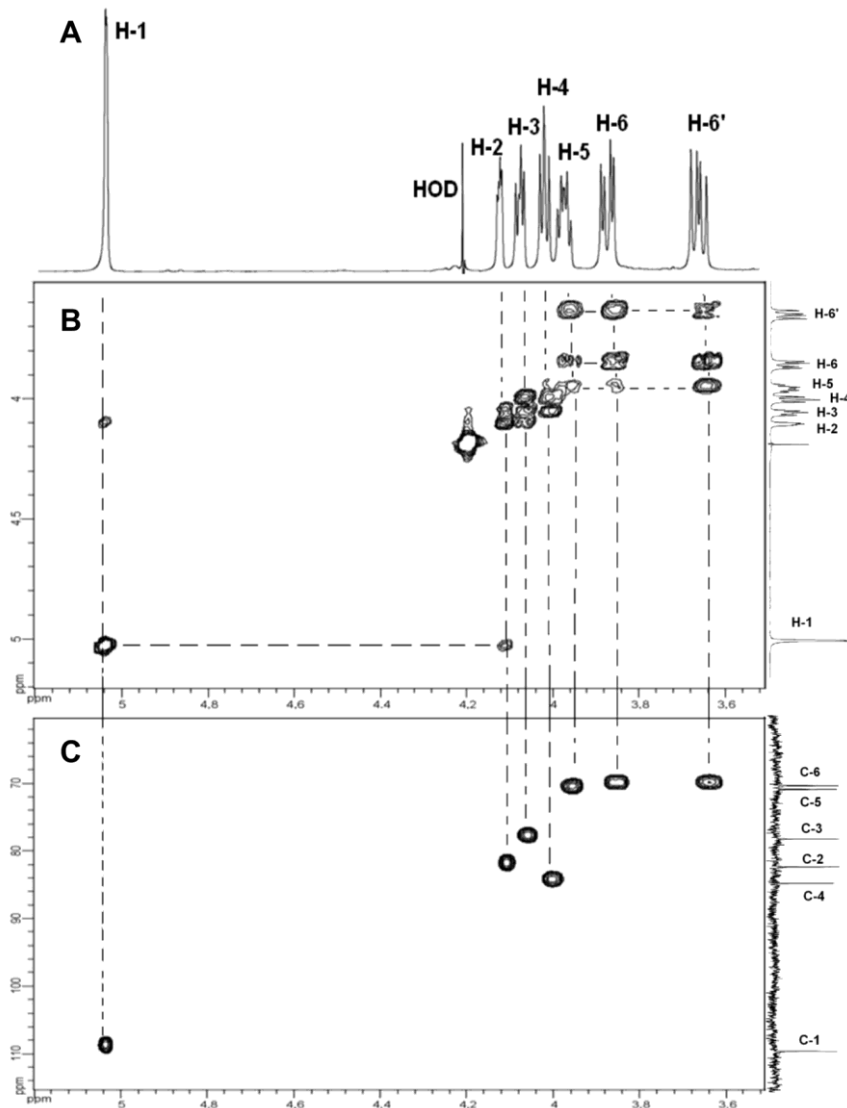


Figure 3: NMR spectra of EPS produced by Mmm. A: ^1H NMR spectrum, B: 2D COSY NMR spectrum and C: 2D HSQC NMR spectrum.
doi:10.1371/journal.pone.0068373.g003

(GalE) and the other for a glucose-1-phosphate uridylyltransferase (GalU) that uses glucose-1-phosphate to generate UDP-glucose. Glucose intake in Mmm certainly relies on two similar (47%) glucose PTS permeases (MSC_0054 and MSC_0860/873) that have been identified in strain PG1^T [23] and are also present in the Gladysdale strain. The PTS glucose permeases usually allow the concomitant uptake and phosphorylation of glucose into glucose-6-phosphate [53], the typical precursor of glycolysis. The probability that glucose intake might be mediated by other generic permeases, such as ABC transporter, is low since it would require further activation of glucose by phosphorylation that is impaired because of the mutation of the two glucokinase genes in PG1^T [23]. Entry into the galactan biosynthetic pathway further requires the isomerization of glucose-6-phosphate to glucose-1-phosphate, which is most probably achieved by the phosphoglucumutase (ManB) predicted in Mmm (MSC_0829, [5]). It has been shown recently in *Vibrio cholerae* that glucose PTS permeases are general regulators of genes involved in EPS synthesis [54]. In our model, we hypothesize that MSC_0860/873 might play a role in the

regulation of the attachment/release of galactan, its impairment in OP variants resulting in a constitutive attachment of the galactan.

Three predicted glycosyltransferases (GT), cps (MSC_0109), EpsG (MSC_0108) and MSC_0771 previously identified in the Mmm PG1^T genome [5] are good candidates for elongation of the galactan chain from the UDP-galactofuranose precursor. MSC_0109 (cps) showed 45% and 42% similarity with glycolipid synthases described in *M. genitalium* [55] and *M. pneumoniae* [56], respectively. In *Mycoplasmas*, glycolipid synthases are able to transfer galactosyl and glucosyl residues to membrane-bound diacylglycerol [57]. Therefore, MSC_0109 is a good candidate for galactan attachment to the cytoplasmic membrane. This was supported by preliminary northern blot experiments that showed a differential expression of the cps gene in capsulated versus non-capsulated colony variants (Figure S1).

Functional prediction of EpsG using HHPred [34] and Phyre2 [33] revealed a structure that was highly similar (e-value = $3.4\text{e-}38$, probability 100%) to that of the cellulose synthase BcsA of *Rhodobacter sphaeroides* [58]. Synthases are membrane-embedded glycosyltransferases involved in polymer formation and transloca-

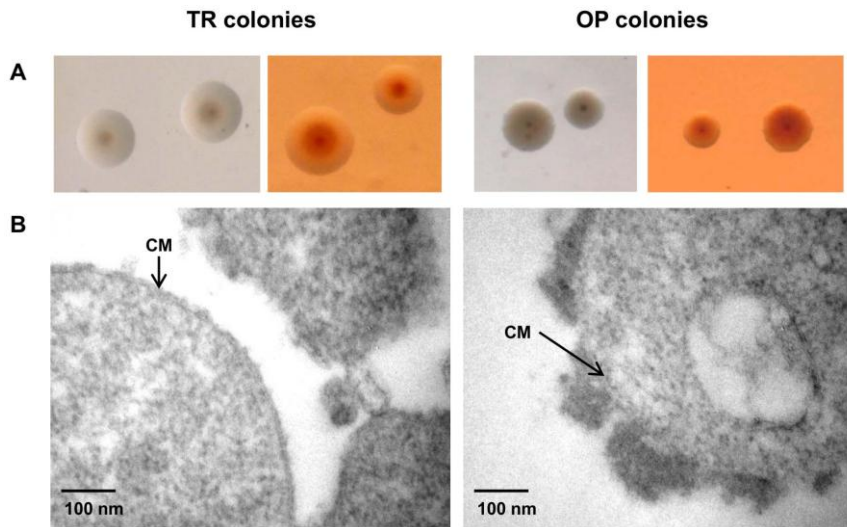


Figure 11.4: PG1T colony opacity is related to the presence of capsular material. A: Colony morphology of PG1T opaque (OP) and translucent (TR) colony variants grown on PPLO supplemented agar with (right) or without (left) Congo red. Magnification: x30. B: Electron microscopy of Ruthenium red-stained PG1T OP and TR colonies. CM: cytoplasmic membrane. doi:10.1371/journal.pone.0068373.g004

tion across the cytoplasmic membrane [59]. Four potential transmembrane regions were predicted by TMHMM2 [32] for EpsG, with a large cytoplasmic loop (36–312) (Figure S2) which showed homology with family 2 glycosyltransferases (<http://www.cazy.org>, [31]), a group of GT known to add sugars in the β -configuration which is in agreement with the galactan structure. Two conserved motifs (DXD and QxxRW), which are common

markers of processive enzymes in various bacterial models [60], were found in the cytoplasmic loop (Figure S2). Further structural analysis showed that the cytoplasmic domain was similar (e-value = 2.8×10^{-26} , probability 99.93%) to the UDP-galactofuranosyl glycotransferase GlfT of *Mycobacterium tuberculosis* [61]. We therefore hypothesized that EpsG is a putative galactan synthase which could catalyze the polymerization of β -1,6-linked galacto- furanose and facilitate its export across the cytoplasmic membrane. Furthermore, synthase-dependent exopolysaccharide secretion was shown to occur in the presence or absence of a lipid acceptor molecule [59]. In our model, synthase-dependent galactan synthesis might be active whether galactan is attached to a glycolipid anchor, or not.

The third predicted GT, MSC_0771, was not related to any of the 90 GT families described so far. Structural analysis revealed two domains of which only the N-terminal one (1–199) was similar to diverse bacterial and eukaryotic glycosyltransferases. Its role in galactan biosynthesis remains hypothetical.

In conclusion, this *in silico* analysis points toward i) a synthase-dependent pathway for galactan synthesis, ii) a putative role of MSC_0109 in attachment of galactan to the membrane and iii) a potential regulation of this attachment by glucose PTS permease. However detailed functional studies are now needed to unravel the precise roles of each GT and the genetic basis and triggering conditions underlying the switch between capsule production (OP colony variants) and EPS secretion (TR colony variants).

Conclusions

We have developed a simple method for the purification of Mmm EPS. The incubation of washed mycoplasma cells in a completely defined medium, able to support cellular metabolism, allowed EPS synthesis for at least 72 hours, while preventing contamination with polysaccharides from the culture medium. Preliminary results in our laboratory indicate that this method is suitable for use in other mycoplasmas.

This method was applied to characterize the free EPS secreted by Mmm. Purified EPS had an identical β -(1.6)-galactofuranosyl structure to that of Mmm capsular galactan. The presence of OP and TR colony variants in Mmm cultures, which varied greatly in

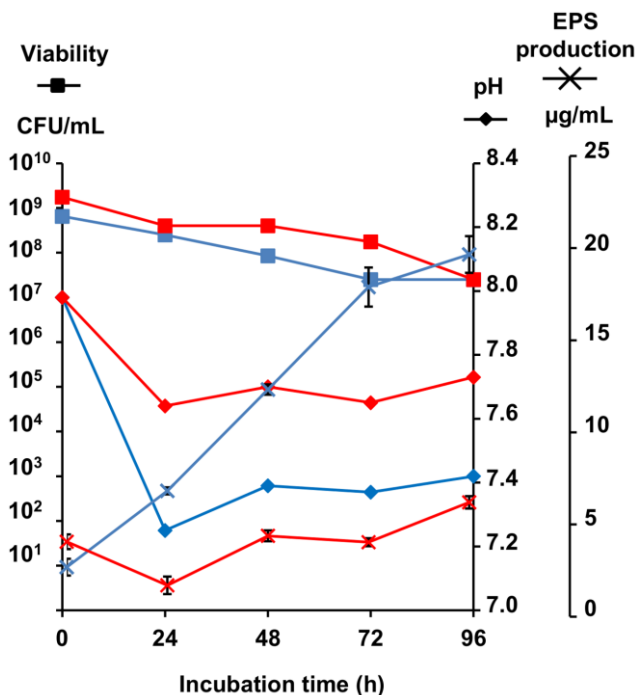


Figure 5: Growth, pH and exopolysaccharide (EPS) secretion of translucent (blue) and opaque (red) colony variants in CMRL-1066 medium. 50 ml of CMRL-1066 medium were inoculated with 10^8 – 10^9 CFU/mL and incubated for 96 hours. Viable titer, pH and EPS production were determined every 24 h. doi:10.1371/journal.pone.0068373.g005

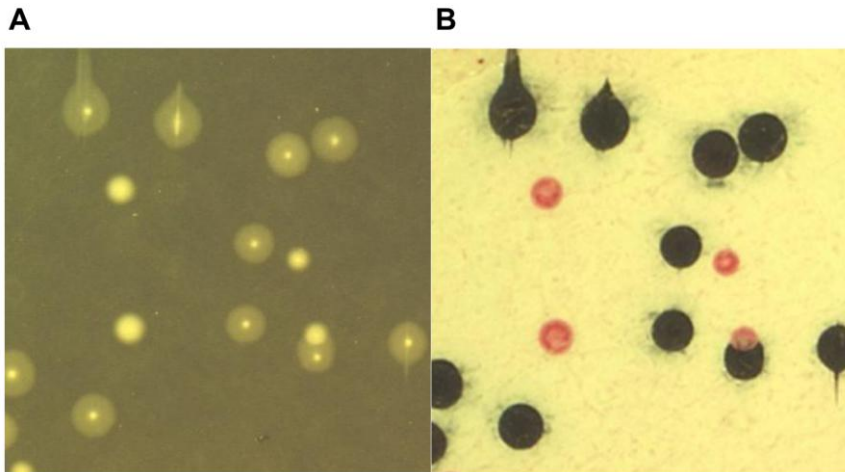


Figure 6: Variation in Mmm colony opacity associated to antigenic variation of the glucose PTS permease. A: Mmm strain Afadé colonies on PPL0 supplemented agar observed under stereomicroscope with indirect light. B: Colony-blotting performed from the same plate using the 3F3 monoclonal antibody. (Magnification: x10).
doi:10.1371/journal.pone.0068373.g00.

their capacity to produce free EPS, was observed. Both variants appeared to be able to synthesize polysaccharides. However, these polysaccharides either remained attached to the cells, constituting a capsule (opaque colony variants), or were released into the culture medium as free EPS (translucent colony variants). We finally conducted *in silico* analyses of Mmm genes potentially involved in polysaccharide biosynthesis and proposed candidate pathways that might account for the alternative production of capsular versus free galactan by the corresponding opaque and translucent colony variants.

In *Streptococcus pneumoniae* spontaneous phase variation between opaque and translucent colony variants has been associated with diverse levels of virulence at different stages of the disease, from invasion to transmission [62]. It remains to be elucidated whether variations in the production of capsular versus free galactan can regulate Mmm pathogenicity and how. Although free galactan has been found in the body fluids and urine of infected animals [12,63], the occurrence and proportion of EPS versus capsule-producing variants *in vivo* has yet to be determined. This would constitute a key step in the understanding of Mmm pathogenicity, since the emergence of sub-populations in a given ecological niche is known to lead to bacterial persistence.

Supporting Information

Figure S1 Northern blot hybridization of total RNA of the opaque (OP) and translucent (TR) colony variants of Mmm strain

References

- Razin S, Yorgev D, Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1094–1156.
- Yus E, Maier T, Michalodimitrakis K, van Noort V, Yamada T, et al. (2009) Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. *Science* 326: 1263–1268.
- OIE (2008) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.4.9. Contagious bovine Pleuropneumonia. Available: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.09_CBPP.pdf. Accessed 2013 Feb 8.
- Nicholas RA (2011) Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. *Vet Rec* 168: 459–462.
- Westberg J, Persson A, Holmberg A, Goesmann A, Lundeberg J, et al. (2004) The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res* 14: 221–227.
- Wise KS, Calcutt MJ, Foecking MF, Madupu R, DeBoy RT, et al. (2012) Complete genome sequences of *Mycoplasma leachii* strain PG50T and the pathogenic *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony biotype strain Gladysdale. *J Bacteriol* 194: 4448–4449.
- Pilo P, Frey J, Vilei EM (2007) Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet J* 174: 513–521.
- Buttery J, Moxon ER (2002) Capsulate bacteria and the lung. *Br Med Bull* 61: 63–80.
- Buttery SH, Plackett P (1960) A specific polysaccharide from *Mycoplasma mycoides*. *J Gen Microbiol* 23: 357–368.
- Plackett P, Buttery SH (1963) A Galactofuranose Disaccharide from the Galactan of *Mycoplasma mycoides*. *Biochem J* 90: 201–205.
- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13: 20–26.

Afadé with a *cps* (MSC_0109) or rDNA 16S probe. Total RNA extraction and northern blot hybridization was performed as previously described [1]. The rDNA 16S probe was obtained by PCR [2]. Transcription of the rDNA 16S was used to normalize the hybridization. The *cps* gene probe was obtained by PCR with specific primers (59 TGATGGATCAACAGATAACACCA 39 and 59 TTTGGCGTGAGTATCAATAAG 39). (DOC)

Figure S2 Schematic representation of the predicted membrane topology of Mmm EpsG (MSC_0108) glycosyltransferase. Numbers indicate the localization of transmembrane helices. DxD (red) and RxxQW (blue) motifs are showed. (TIF)

Acknowledgments

We express our gratitude to A. Paoli and V. Lefriand for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PG CB. Analyzed the data: PG F. Tardy CPR JC. Project conception: FP F. Thiaucourt LMS. Electron microscopy: PG DLG. Monomer composition and NMR analysis: CPR JC. All other experiments: PG CB. Drafted the manuscript: F. Tardy PG CPR LMS. Critically reviewed the manuscript and approved the final version: CB CPR JC LMS F. Thiaucourt F. Tardy DLG FP PG.

12. Turner AW (1962) Circulating *M. mycoides* antigen as a cause of loss agglutination and complement fixation reactivity during acute pleuropneumonia. *Austral Vet J* 38: 401.
13. March JB, Jones GE, Hitchen P, Morris HR, Dell A (1999) Analysis of the capsular polysaccharide of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, the causal agent of CBPP: purification, composition and its role in infection and immunity. *COST*: 69–72.
14. March JB, Brodlić M (2000) Comparison of the virulence of European and African isolates of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony type. *Vet Rec* 147: 20–21.
15. Shifrine M, Gourlay RN (1965) Serological relationship between galactans from normal bovine lung and from *Mycoplasma mycoides*. *Nature* 208: 498–499.
16. Buttery SH, Lloyd LC, Titchen DA (1976) Acute respiratory, circulatory and pathological changes in the calf after intravenous injections of the galactan from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *J Med Microbiol* 9: 379–391.
17. Hudson JR, Buttery S, Cottew GS (1967) Investigations into the influence of the galactan of *Mycoplasma mycoides* on experimental infection with that organism. *J Pathol Bacteriol* 94: 257–273.
18. Lloyd LC, Buttery SH, Hudson JR (1971) The effect of the galactan and other antigens of *Mycoplasma mycoides* var. *Mycoides* on experimental infection with that organism in cattle. *J Med Microbiol* 4: 425–439.
19. McAuliffe L, Ayling RD, Ellis RJ, Nicholas RA (2008) Biofilm-grown *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC exhibit both phenotypic and genotypic variation compared with planktonic cells. *Vet Microbiol* 129: 315–324.
20. Pilo P, Vilei EM, Peterhans E, Bonvin-Klotz L, Stoffel MH, et al. (2005) A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J Bacteriol* 187: 6824–6831.
21. Abdo el M, Nicolet J, Miserez R, Gonçalves R, Regalla J, et al. (1998) Humoral and bronchial immune responses in cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Vet Microbiol* 59: 109–122.
22. Poumarat F, Perrin B, Longchambon D (1991) Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet Microbiol* 29: 329–338.
23. Gaurivaud P, Persson A, Grand DL, Westberg J, Solsona M, et al. (2004) Variability of a glucose phosphotransferase system permease in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony. *Microbiology* 150: 4009–4022.
24. Brocchi E, Gamba D, Poumarat F, Martel JL, De Simone F (1993) Improvements in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia through the use of monoclonal antibodies. *Rev Sci Tech* 12: 559–570.
25. Cochran WG (1950) Estimation of bacterial densities by means of the “most probable number”. *Biometrics* 6: 105–116.
26. De Vuyst L, Vanderveken F, Van de Ven S, Degeest B (1998) Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J Appl Microbiol* 84: 1059–1068.
27. Dubois M, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *analytical chemistry* 28: 350–356.
28. Shi F, Harada T, Ogawa Y, Ono H, Ohnishi-Kameyama M, et al. (2012) Capsular Polysaccharide of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the Causative Agent of Swine Erysipelas, and Its Modification with Phosphorylcholine. *Infect Immun* 80: 3993–4003.
29. Enos-Berlage JL, McCarter LL (2000) Relation of capsular polysaccharide production and colonial cell organization to colony morphology in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 182: 5513–5520.
30. Barré A, de Daruvar A, Blanchard A (2004) MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes. *Nucleic Acids Res* 32: D307–310.
31. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, et al. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37: D233–238.
32. Møller S, Croning MD, Apweiler R (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17: 646–653.
33. Kelley LA, Sternberg MJ (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4: 363–371.
34. Söding J, Biegert A, Lupas AN (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* 33: W244–248.
35. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
36. Plackett P, Buttery SH, Cottew GS (1963) Carbohydrates of some mycoplasma strains. Recent Progress in Microbiology Symposia of the 8th congress of Microbiology, Montreal, Canada: 535–547.
37. Freundt EA (1983) Culture media for classic mycoplasmas. *Methods in Mycoplasmaology* volume 1: mycoplasma characterization: 127–135.
38. Rodwell AW, Abbot A (1961) The function of glycerol, cholesterol and long-chain fatty acids in the nutrition of *Mycoplasma mycoides*. *J Gen Microbiol* 25: 201–214.
39. Gonçalves VM, Takagi M, Carneiro SM, de Campos Giordano R, Tanizaki MM (2006) Introduction of air in the anaerobic culture of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F induces the release of capsular polysaccharide from bacterial surface into the cultivation medium. *J Appl Microbiol* 101: 1009–1014.
40. Sutherland IW (1972) Bacterial exopolysaccharides. *Adv Microb Physiol* 8: 143–213.
41. Smith GR, Oliphant JC (1982) Some in-vitro characters of the subspecies of *Mycoplasma mycoides*. *J Hyg (Lond)* 89: 521–527.
42. Beynon LM, Richards JC, Perry MB (1997) Identification of the common antigenic determinant shared by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 35A and 20 capsular polysaccharides—structural analysis of the *Streptococcus pneumoniae* serotype 35A capsular polysaccharide. *Eur J Biochem* 250: 163–167.
43. Cordeiro LM, Beilke F, Bettim FL, Reinhardt Vde F, Rattmann YD, et al. (2012) (1→2) and (1→6)-linked beta-D-galactofuranan of microalga *Myrmecia biatorellae*, symbiotic partner of *Lobaria linita*. *Carbohydr Polym* 90: 1779–1785.
44. de Rezende CE, Anriany Y, Carr LE, Joseph SW, Weiner RM (2005) Capsular polysaccharide surrounds smooth and rugose types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Appl Environ Microbiol* 71: 7345–7351.
45. Yildiz FH, Schoolnik GK (1999) *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4028–4033.
46. Liss A, Heiland RA (1983) Colonial opacity variation in *Mycoplasma pulmonis* *Infect Immun* 41: 1245–1251.
47. Rosengarten R, Wise KS (1991) The Vlp system of *Mycoplasma hyorhinis*: combinatorial expression of distinct size variant lipoproteins generating high-frequency surface antigenic variation. *J Bacteriol* 173: 4782–4793.
48. Minga UM (1981) Smooth and rough colony types of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*: in vitro characterization and pathogenicity in cattle. *Tanzania Veterinary Bulletin* 3: 53–62.
49. Swanson J (1978) Studies on gonococcus infection. XII. Colony color and opacity variants of gonococci. *Infect Immun* 19: 320–331.
50. Koplin R, Brisson JR, Whitfield C (1997) UDP-galactofuranose precursor required for formation of the lipopolysaccharide O antigen of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1 is synthesized by the product of the *rfbDKPO1* gene. *J Biol Chem* 272: 4121–4128.
51. Kremer L, Dover LG, Morehouse C, Hitchin P, Everett M, et al. (2001) Galactan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Identification of a bifunctional UDP-galactofuranosyltransferase. *J Biol Chem* 276: 26430–26440.
52. Holden HM, Rayment I, Thoden JB (2003) Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J Biol Chem* 278: 43885–43888.
53. Saier MH Jr, Reizer J (1992) Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *J Bacteriol* 174: 1433–1438.
54. Houot L, Chang S, Pickering BS, Absalon C, Watnick PI (2010) The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation through multiple independent pathways. *J Bacteriol* 192: 3055–3067.
55. Andre's E, Martinez N, Planas A (2011) Expression and characterization of a *Mycoplasma genitalium* glycosyltransferase in membrane glycolipid biosynthesis: potential target against mycoplasma infections. *J Biol Chem* 286: 35367–35379.
56. Klement MLR, Ojemir L, Tagscherer KE, Widmalm G, Wieslander A (2007) A processive lipid glycosyltransferase in the small human pathogen *Mycoplasma pneumoniae*: involvement in host immune response. *Mol Microbiol* 65: 1444–1457.
57. Andre's E, Biette's X, Fajjes M, AP (2012) Bacterial glycolipid synthesis: processive and non-processive glycosyltransferases in mycoplasma. *Biocatalysis and Biotransformation* 30: 274–287.
58. Morgan JL, Strumillo J, Zimmer J (2013) Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* 493: 181–186.
59. Whitney JC, Howell PL (2013) Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol* 21: 63–72.
60. Saxena IM, Brown RM Jr, Fevre M, Geremia RA, Henrissat B (1995) Multidomain architecture of beta-glycosyl transferases: implications for mechanism of action. *J Bacteriol* 177: 1419–1424.
61. Wheatley RW, Zheng RB, Richards MR, Lowary TL, Ng KK (2012) Tetrameric structure of the GlfT2 galactofuranosyltransferase reveals a scaffold for the assembly of mycobacterial Arabinogalactan. *J Biol Chem* 287: 28132–28143.
62. Hava DL, LeMieux J, Camilli A (2003) From nose to lung: the regulation behind *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* 50: 1103–1110.
63. Gourlay RN (1962) Polysaccharide haptens from urine of cattle infected with *Mycoplasma mycoides*. *Nature* 195: 99.

III. Résultats complémentaires

III.1. Introduction

Afin d'initier des études sur le rôle du galactane dans le pouvoir pathogène de *Mmm*, la recherche d'un mutant déficient dans la production du polysaccharide a été réalisée. La banque de mutants a été obtenue, lors de travaux antérieurs, par transposition aléatoire dans le génome de la souche africaine hautement pathogène *Mmm* 8740 (**ANNEXE IV**). Le lieu d'insertion du transposon dans le génome des mutants est caractérisé, nous permettant ainsi d'effectuer une sélection de mutants d'intérêt. Ainsi, des mutants présentant une interruption dans un gène potentiellement impliqué dans le transport, la biosynthèse du composé et de ces précurseurs ont été présélectionnés. La production de galactane par ces mutants a été criblée à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques anti-galactane préparés à partir d'extraits d'EPS de *Mmm* selon la méthode mise au point dans notre étude.

III.2. Matériel et Méthodes

III.2.1. Souches, mutants et conditions de culture

Deux souches ont été utilisées dans cette étude : *Mmm* Afadé, pour la production des anticorps monoclonaux et *Mmm* 8740 qui a servi à développer la banque de mutants. Les mycoplasmes ont été cultivés en milieu Hayflick modifié (37°C, 5% CO₂) dont la composition est décrite dans l'article 1 (chapitre II) avec un supplément en kanamycine (100 µg/mL) pour la culture des mutants. Les mutants, conservés à -80°C, sont remis en culture en milieu de sélection, étalés sur milieu gélosé et des clones sont ensuite isolés.

III.2.2. Préparation des échantillons

Une fois les cultures poussées, les mycoplasmes sont récupérés par centrifugation (12 000g, 45min, 4°C). Ils sont lavés une fois en PBS stérile. Des aliquotes de mycoplasmes et de surnageant sont mis de côté à -80°C pour les dot blot. Les mycoplasmes sont utilisés pour la production et l'extraction d'EPS, en milieu simplifié (milieu de Hayflick sans sérum et sans extrait de levures fraîches) pour les immunisations des souris et en CMRL pour la sélection

des anticorps monoclonaux et les analyses de mutants, selon le protocole de production et d'extraction des EPS décrit dans l'article 1 (chapitre II).

III.2.3. Production des anticorps monoclonaux

Dix souris Balb/c sont immunisées avec les extraits d'EPS issus de la souche Afadé. Les extraits sont préalablement filtrés sur 0,22µm (Millipore) puis mélangés avec de l'adjuvant complet de Freund pour la première injection et de l'adjuvant incomplet pour les suivantes. Les souris sont immunisées par voie intrapéritonéale quatre fois entrecoupées de un mois. Trois semaines après la dernière injection, un boost intraveineux est réalisé avec 50µg d'EPS. Au bout de 3 jours, les souris sont euthanasiées, les rates prélevées puis dilacérées à l'aide d'un scalpel. Les cellules spléniques sont ensuite fusionnées avec des cellules de myélome murines SP2/O. La fusion et le clonage ont été réalisés selon le protocole standard (Harlow & Lane, 1988).

III.2.4. Sélection des clones d'hybridomes positifs et analyse des mutants de la banque

Les surnageants de culture d'hybridome positifs sont sélectionnés par dot blot, testés à la fois sur les extraits d'EPS de *Mmm* (contrôle positif) et sur de l'extrait d'EPS de milieu Hayflick modifié non inoculé (contrôle négatif). Une goutte de chaque extrait est déposée sur une bandelette de nitrocellulose. La bandelette est ensuite incubée 20min dans du tampon de blocage (PBS 1x + 10% de sérum de cheval) puis avec les surnageants de culture des hybridomes à tester durant 30min. Elle subit ensuite 2 lavages en PBS 1x-Tween 0,02% et un lavage en PBS 1x de 5min et est incubée avec du conjugué HRP anti-souris dilué au 1/300^{ème} (P0260 DAKO). La bandelette est de nouveau lavée trois fois puis révélée avec du DAB (3-3' Diaminobenzidine) 0,6 mg/mL (SIGMA ALDRICH)-NiCl₂ 0,03% en PBS 1x.

Les culots, les surnageants de culture et les extraits d'EPS issus des cultures de mutants sont déposés et manipulés de la même manière que les extraits d'EPS précédents excepté qu'ils sont incubés avec le surnageant d'hybridome 2.1.31 qui a réagi positivement aux EPS de *Mmm* lors de la sélection des hybridomes.

III.3. Résultats :

III.3.1. Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre le galactane de *Mmm*

Deux fusions ont été nécessaires pour obtenir des Mab spécifiques du galactane de *Mmm*. Plus de 300 clones d'hybridomes ont été isolés et leur surnageant de culture, contenant les anticorps, a été testé par dot blot contre des EPS purifiés de *Mmm* et en contrôle négatif du milieu de Hayflick (**Fig. II.7A**). Sur ces 300 clones, 5 ont été retenus (données non montrées). Un seul de ces clones (2.1.31) a finalement été choisi comme producteur des Mabs anti-galactane car il s'agissait du clone qui poussait le mieux et dont le surnageant donnait les meilleures réponses en immunodétection. Sur la **Figure II.7B**, le Mab 2.1.31 détecte le galactane dans un extrait de cellules mycoplasmaïques, du surnageant de culture et en extrait purifié.

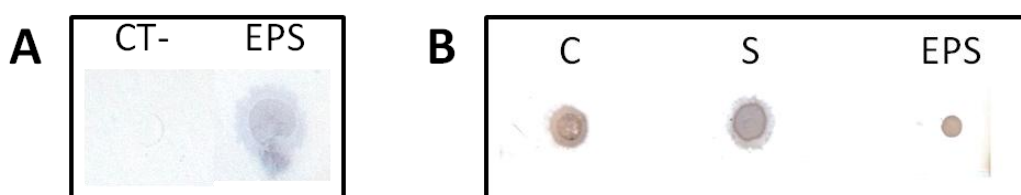


Figure II.7 : Le Mab 2.1.31 reconnaît le galactane de *Mmm* souche Afadé.

Les Mabs produits par le clone d'hybridome 2.1.31, utilisés en immunodétection par dot blot, reconnaissent le galactane purifié de *Mmm* mais pas le milieu de culture (**A**). Les Mabs détectent le galactane dans des échantillons de cellules mycoplasmaïques et dans le surnageant de culture (**B**). **CT-** : milieu de culture, **EPS** : galactane purifié (exopolysaccharides), **C** : cellules mycoplasmaïques, **S** : surnageant.

III.3.2. Recherche de mutants déficients dans la production de galactane

L'insertion du transposon dans le génome des mutants étant caractérisée (**ANNEXE IV**), les mutants testés ont été présélectionnés selon la liste des gènes candidats à la biosynthèse du galactane établie dans l'article 1 (chapitre II) (**Table II.1**). Tous ces gènes ne sont pas représentés dans la banque dont la perméase MSC_0860/0873, galU et deux des glycosyltransférases. De plus, certains de ces gènes sont présents en copies multiples voire sous forme pseudogénisée dans le génome.

Gène	Fonction prédite	CDS	Pseudogène	Mutant disponible
ptsG	Transporteur du glucose (Composant IIBC-système PTS)	MSC_0054		Oui
ptsG		MSC_0860 MSC_0873		Non
manB	Phosphoglucomutase	MSC_0829		Oui
galU	G1P uridylyltransferase	MSC_0110 MSC_0990		Non
galE	UDP Glc-4-épimérase	MSC_0971 MSC_0978	MSC_0984b MSC_0985	Oui
glf	UDP Gal pyranose mutase	MSC_0970 MSC_0977 MSC_0984		Oui
cps	Glycosyltransferase	MSC_0109		Non
cps		MSC_0771 MSC_0974 MSC_0982 MSC_0988		Oui
epsG		MSC_0108 MSC_0973 MSC_0987 MSC_0993	MSC_0980	Non
epsG				

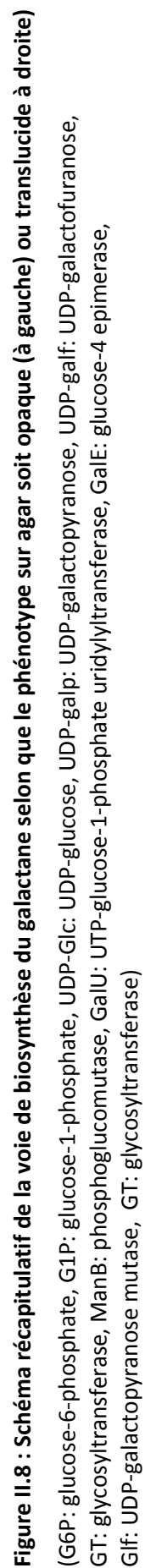
Table II.2 : Gènes suspectés d'être impliqués dans la biosynthèse du galactane.

Les annotations sont issues de base de données Molligen. (G1P: Glucose-1-Phosphate, Glc: glucose, Gal: galactose)

Des échantillons de cellules mycoplasmaïques, de surnageants de culture et d'extrait d'EPS sont testés avec le Mab 2.1.31 pour chaque mutant ainsi que pour la souche contrôle 8740 ayant servi à construire la banque. Tous les mutants se sont révélés positifs en immunodétection (données non montrées). Aucun mutant déficient dans la production d'exopolysaccharides n'a pu être mis en évidence.

IV. Points de conclusion du chapitre II

- Notre méthode de production et d'isolement des EPS de mycoplasmes des surnageants de culture est validée. Grâce à ce protocole, il nous a été possible de caractériser et de doser les EPS de *Mmm*.
- Les EPS de *Mmm* possèdent une structure en β -(1-6) galactofuranose soit la même structure que ses CPS excepté que, dans le cas des EPS, l'homopolymère n'est pas lié à un lipide.
- *Mmm*, cultivé sur agar, donne naissance à des variants intraclonaux dont les phénotypes opaque ou translucide sont directement liés à la production de galactane sous forme CPS ou EPS, elle-même corrélée à l'expression ou non d'un transporteur de glucose (**Fig. II.8**).
- L'exploitation de la banque pour la recherche d'un mutant déficient dans la production de galactane s'est révélée infructueuse. Les mutants d'intérêt se sont avérés tous producteurs de galactane. Le fait que certains gènes clés de la biosynthèse soient présents en multicopies identiques ou sous la forme de pseudo-gènes dans le génome de *Mmm* pourrait expliquer cet échec. Par ailleurs des mutants d'intérêt potentiels ne sont pas représentés dans la banque.





CHAPITRE III

ÉTUDE DES POLYSACCHARIDES SECRÉTÉS DES MYCOPLASMES

MEMBRES DU GROUPE « MYCOIDES »

I. Résumé

Caractérisation des polysaccharides sécrétés par les mycoplasmes du groupe « mycoides », et des voies métaboliques qui pourraient leur être associées.

Le groupe « mycoides » comprend cinq espèces, toutes pathogènes des ruminants : *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*), *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) sérovars « LC » et « capri », *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*) and *M. leachii*. Deux espèces, *Mmm* et *Mccp*, responsables de maladies notifiables, sécrètent des polysaccharides capsulaires (CPS) et des exopolysaccharides (EPS). Les mycoplasmes ne possédant aucun des facteurs de virulence classiquement décrits chez les bactéries et la forte suspicion de l'implication des polysaccharides de *Mmm* dans sa pathogénicité nous a conduit à nous pencher sur la caractérisation de ces molécules et leurs voies de biosynthèse pour tous les membres du groupe « mycoides ».

La structure de leurs EPS a été déterminée par RMN. Les EPS de *Mmm*, tel que démontré dans une étude précédente portant sur une autre souche, sont similaires au produit capsulaire, un homopolymère de β -(1-6) galactofuranose. *M. leachii* et *Mccp* produisent un EPS différent : un homopolymère de β -(1-2) glucopyranose. Aucun EPS n'a été détecté pour *Mmc* et *Mcc*. Des anticorps monoclonaux, reconnaissant les deux EPS caractérisés, ont été utilisés afin de localiser les formes capsulaires correspondantes notamment chez ces deux espèces et pour étudier de plus près la localisation des polysaccharides sur un plus large panel de souches. Les résultats montrent, pour les deux sérovars de *Mmc* et plusieurs souches de *Mcc*, une hétérogénéité prononcée en terme, respectivement, de composé sécrété et de leur capacité à sécréter à la fois des CPS plus de des EPS ou des CPS mais pas d'EPS. Les gènes associés aux voies de biosynthèse des polysaccharides ont été identifiés pour les cinq espèces et démontrent une corrélation avec le polysaccharide produit. En outre, une étude phylogénétique a révélé que la plupart des gènes détectés pourraient avoir été acquis par transfert horizontal.

II. Article 2 (version provisoire)

Characterization of the secreted polysaccharides of the *Mycoplasma* mycoides cluster and their possible associated genomic pathways.

Clothilde Bertin^{1,2,4,5}, Corinne Pau-Roblot³, Josiane Courtois³, Lucía Manso-Silván^{1,2}, Florence Tardy^{4,5}, François Poumarat^{4,5}, Matthieu Dejean^{1,2}, Patrice Gaurivaud^{4,5}, François Thiaucourt^{#1,2}

- 1- Centre International de Recherche en Agronomie pour le Développement, UMR CMAEE, Montpellier, France
- 2- Institut National de Recherche Agronomique, UMR1309 CMAEE, Montpellier, France
- 3- Unité Biologie des Plantes et Innovation, EA 3900, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France
- 4- Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Laboratoire de Lyon, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Lyon, France
- 5- Université de Lyon, VetAgro Sup, UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Marcy-L'étoile, France,

II.1. Abstract

The “*Mycoplasma mycoides*” cluster (MMC) comprises five species all pathogenic for ruminants: *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*), *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) “LC” and “capri” serovars, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*) and *M. leachii*. Two species, *Mmm* and *Mccp*, are the causative agents of two major diseases and are known to secrete capsular polysaccharides (CPS) and free exopolysaccharides (EPS). These mycoplasmas do not possess any of the classical virulence factors found in other bacteria. However previous studies have strongly suggested an implication of *Mmm* polysaccharides in pathogenicity. Because mycoplasmas require rich, complex media for growth, the characterization of these polysaccharides was difficult and former studies targeted the CPS. Recently, the EPS secreted by *Mmm* was purified by incubation of mycoplasma cells in a defined medium, allowing its characterization as a β -(1-6) galactofuranose homopolymer identical to the capsular product. The objective of this study was to characterize the polysaccharides of all other members of the cluster and to analyze their biosynthetic pathways.

EPS structure was determined by nuclear magnetic resonance. *M. leachii* and *Mccp* produced a different EPS, a β -(1-2) glucopyranose homopolymer. Monoclonal antibodies recognizing *Mmm*-galactan and *Mccp*-glucan were used to localize the corresponding CPS by the different cluster species using a panel of strains. Within *Mmc*, strains corresponding to the “LC” serovar produced only capsular galactan, while strains of the “capri” serovar did not produce any detectable product. *Mcc* produced glucan but contrary to *Mmc* serovar “capri” strains, results were very heterogeneous concerning the presence and the localization of the secreted product. The genes associated to the polysaccharide biosynthetic pathways were identified in the five species and were correlated to the chemical composition of polysaccharides. In addition, a phylogenetic study revealed that many of these genes could be acquired by horizontal gene transfer as there was no congruence between gene trees and the phylogenetic tree of the clade.

II.2.Introduction

Within the mollicutes, there is a group of mycoplasma species which is quite unique called the MMC (**Cottew, et al., 1987**). Based on phylogenetic trees deriving from 16S rRNA sequences, MMC belongs to the "spiroplasma-entomoplasma-mycoides" (SEM) clade, which includes a number of species isolated from plants and/or insects (**Gasparich, et al., 2004**). However, all the members of the MMC are pathogenic for ruminants. The taxonomy of the MMC was modified recently to reflect more precisely the phylogeny of this group. Because all the members of the MMC are closely related, the 16S rRNA sequences (**Weisburg, et al., 1989**) did not provide a sufficient resolution to discriminate these strains. A multi-locus sequence typing approach was used, which lead to a simplification of the taxonomy with assignment of species or subspecies names for each of its members (**Manso-Silvan, et al., 2009**) (**Table III.1**).

Among the MMC, two subspecies are particularly important, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (*Mmm*) and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*) and which are causing respectively contagious caprine pleuropneumonia (CCPP) and contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). These two diseases are characterized by unilateral pleuropneumonia lesions in goats and cattle respectively. Because they are absent or have been eradicated from many regions or continents they are notifiable to the world organization for animal health (OIE) and their detection leads to a ban on live animal trade. By comparison, the other members of the MMC have a worldwide distribution and may induce lesions affecting various organs: mastitis, arthritis, keratitis, pneumonia, septicemia etc.

Mycoplasma Mycoides Cluster						
	Mycoides sub-cluster			Capricolum sub-cluster		
	M. m. subsp. <u>capri</u>	M. m. subsp. <u>mycoides</u> LC	M. m. subsp. <u>mycoides</u> SC	M. sp. Group7	M.c. subsp. <u>capricolum</u>	M.c. subsp. <u>capripneumoniae</u>
1987 taxonomy ^a						
Actual taxonomy ^b	M. m. subsp. <u>capri</u>		M. m. subsp. <u>mycoides</u> "SC"	M. <u>leachii</u>	M.c. subsp. <u>capricolum</u>	M.c. subsp. <u>capripneumoniae</u>
Ref Strain	PG3		PG1	PG50	<u>CKid</u>	F38
Strain used	95010		PG1	PG50	<u>CKid</u>	M1601
Full genome sequences	NC_015431.1		NC_005364.2	NC_014751.1	NC_007633.1	NZ_CM001150.1

Table III.1. Taxonomy of the mycoplasma mycoides cluster and genomic sequences used to study EPS biosynthetic pathways.

^a based on Cottew et al. (Cottew, et al., 1987)

^b based on Manso-Silvan et al. (Manso-Silvan, et al., 2009)

The release of the awaited whole genome sequence of *Mmm* in 2004 (Westberg, et al., 2004) did not allow the identification of any known virulence factors such as genes coding for toxins, adhesins or secretion systems. The close association to host cells and the release of H₂O₂ and reactive oxygen species through glycerol metabolism was proposed as a virulence mechanism (Pilo, et al., 2007). However, it appears that the vaccinal strain T1/44 is as cytotoxic as some highly virulent strains (Bishof, 2008) other avenues needed to be explored. Among them, one certainly merits attention, the synthesis and secretion of polysaccharide by *Mmm*. This polysaccharide is either found in association with the mycoplasma membrane forming a capsule (capsular polysaccharide, CPS) or as a free secreted product (exopolysaccharide, EPS). This secretion was documented long ago and EPS were detected as a soluble product in the blood of CBPP-infected cattle at an early stage of the infection with simple techniques such as the "Ouchterlony" immune-precipitation in agar (Kurotchkin, 1937). EPS was soon regarded as a virulence candidate for *Mmm* and immunological reactions to intravenous or subcutaneous inoculations were studied (Shifrine & Gourlay, 1965b). Many efforts were made to characterize them. The composition of *Mmm*-CPS was soon revealed (Buttery & Plackett, 1960) but the characterization of secreted EPS, hampered by the complex medium used for mycoplasmas growth, was more problematic. Recently, a method of extraction, which included the incubation of concentrated mycoplasma cells into a defined medium, followed by chemical analysis revealed that the composition of *Mmm*-EPS matched exactly that of the CPS, i.e. a galactofuranose homopolymer.(Bertin, et al., 2013). Once the technological hurdle of EPS extraction was lifted, the same approach was applied to the other members of the MMC.

The objectives of the study were, first, to characterize their EPS with chemical analyses, then to explore potential heterogeneity of the distribution of MMC polysaccharides (CPS and EPS) by an immunological approach, and finally, to analyze the genetic pathways leading to the production of these polysaccharides.

II.3. Materials and methods

II.3.1. Mycoplasma strains and culture conditions

The strains used in chemical and immunological analyses are listed in **Table III.2**. For biochemical analyses mycoplasma strains with sequenced and annotated genomes and few *in vitro* passages were selected. Mycoplasmas were cultured in PPLO medium according to Hayflick with some modifications [PPLO base (Difco, 21g/l)] enriched with yeast extract (10%), horse serum decomplexed for 1h at 56°C (15%), glucose (1g/l) and sodium pyruvate (2g/l)] at 37°C, 5% CO₂. They were harvested in the late exponential phase of growth (14 000g, 30min, 4°C) and washed once in phosphate buffered saline (PBS).

Species	Strain designation	Lesion/organ	Country	Supplier/reference
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i> (<i>Mcc</i>)	<u>California kid</u> ^T	Arthritis	USA	Cordy, 1955
	<u>7714</u>	NK	NK	NK
	13051 (14232)	Mastitis	France	ANSES
	10074	NK	NK	NK
	2007-046	milk	France	ANSES-Niort
	IPX	NK	France	CIRAD
	2002-053 (VP28L)	NK	India	IVRI
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i> (<i>Mccp</i>)	<u>9231-Abomsa</u>	Pleuropneumonia	Ethiopia	NVI-E
	<u>95043</u>	Pleuropneumonia	Niger	CIRAD
<i>M. leachii</i> (<i>M. leachii</i>)	<u>PG50</u> ^T	Arthritis	Australia	Simmons & Johnston, 1963
	<u>06049-C3</u>	ear swab	Nigeria	NVRI-N
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> serovar <i>capri</i> (<i>Mmc</i> serovar <i>capri</i>)	<u>PG3</u> ^T	Pleuropneumonia	Turkey	Tully, 1974
	2003-045	Pneumonia	India	CIRG
	9139	NK	NK	NK
	N108	NK	Nigeria	FDVR
	L	Mastitis	France	CIRAD
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> serovar LC (<i>Mmc</i> serovar LC)	<u>Y-goat</u> ^T	Peritonitis	Australia	Laws, 1956
	<u>95010-C1</u>	Arthritis	France	CIRAD
	Kombolcha	Pleuropneumonia	Ethiopia	NVI-E
	99045 (55507-1)	Arthritis	Germany	IVRI
	99111	Arthritis	India	TiHo
	2007-073	milk	France	ANSES-Niort
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> (<i>Mmm</i>)	<u>Afadé</u>	Pleuropneumonia	Chad	CIRAD
	<u>8740-Rita</u>	Pleuropneumonia	Cameroon	LANAVET

Table III.2 : Strains used in chemical and immunological analyses.

Strains not underlined have been used for supplementary experiments. Strain^T : Type strain, Strain^R : Reference strain, NK : Not Known. (CIRG: Central Institute for Research in Goats, Mathura, India. Dr. Rana. NVRI-N: National Veterinary Research Institute, Vom, Nigeria. Dr Nwankpa. TiHo: Tierärztliche Hochschule, Hannover, Germany. Dr Schmidt. LANAVET: National Veterinary Laboratory, Garoua, Cameroon, Dr. Souley)

II.3.2. EPS production and extraction

EPS were produced and extracted as described previously (**Bertin, et al., 2013**). EPS production was performed with PPLO-based broth (for monoclonal antibody production, particularly intraperitoneal immunizations) or CMRL-1066 (for all other experiments), each supplemented with 3g/L of glucose, for EPS production and concentration. Briefly, washed mycoplasmas were transferred in PPLO based-broth or CMRL-1066 medium to obtain a final 10^8 to 10^{10} mycoplasmas/mL concentration. Mycoplasmas were further incubated 80h at 37°C. After this incubation, mycoplasmas were pelleted by centrifugation at 14 000g for 1h and 4°C. A proteinase K (Promega) treatment was performed only on PPLO-based broth supernatant (60mg/mL for 4h at 37°C) Then, tri-chloroacetic acid (TCA) was added to the supernatant (1/10 volume (w/v)) and the mixture was incubated at 4°C for 2h. The proteinaceous precipitate was removed after centrifugation (14 000g, 1h, 4°C). Nine volumes of cold acetone were added to the final supernatant and the mixture was incubated at least 24h at -20°C to precipitate EPS. After centrifugation (14 000g, 1h, 4°C) and drying, the EPS pellets were dissolved in ultrapure sterile water. The carbohydrate content of extracts was determined in triplicate by the phenol-sulfuric acid method of Dubois (**DuBois, et al., 1956**). The quantity of residual free glucose (added in CMRL-1066) was evaluated by nuclear magnetic resonance (NMR) and was subtracted from the total carbohydrate results to evaluate the EPS content.

II.3.3. Monosaccharide composition

The monosaccharide components were determined by high-performance anion exchange chromatography (HPAEC) with a pulsed amperometric detector (Dionex ICS 3000 system). After hydrolysis of EPS (1 mg) with 4 M $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (100 °C, 4 h), aliquots of the extract were passed through a 4 x 50 mm CarboPac PA1 pre-column (Dionex) before separation of anionic compounds on a 4 x 250 mm CarboPac PA1 column (Dionex) at 30 °C. Gradient elution was performed with a multi-step gradient as follows: 0-25 min, 90 % H_2O and 10 % NaOH 160 mM; 25-34 min, 100 % NaOH 200 mM; 35-50 min 90 % H_2O and 10 % NaOH 160 mM at a flow rate of 1 mL/min. Peak analysis was performed using Chromeleon software, version 7.0.

II.3.4. NMR spectroscopy

Prior to NMR analysis, samples were exchanged twice with 99.9 % D₂O (Euriso-top), dried under vacuum, and dissolved in 99.96 % D₂O (< 1 mg/0.5 mL). ¹H NMR spectra were recorded, at 80 °C, on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5 mm BBI probe and Topspin 1.3 software. ¹H NMR spectra were accumulated using a 30° pulse angle, a recycle time of 1 s and an acquisition time of 2 s for a spectral width of 3 000 Hz for 32 K data points with a presaturation of the HOD signal using a presaturation sequence provided by Bruker. ¹³C NMR experiments were conducted on the same spectrometer operating at 125.48 MHz with 2 s as relaxation delay.

The 2D ¹H/¹H COSY, ¹H/¹H TOCSY, ¹H/¹H NOESY, ¹H/¹³C HSQC and ¹H/¹³C HMBC spectra were acquired with standard pulse sequences delivered by Bruker.

II.3.5. Monoclonal antibodies production

Balb/c mice were immunized with Mmm-EPS extracts produced in PPLO-based broth. EPS extracts were filtered (0.22µm filters, Millipore) and then mixed with complete and incomplete Freund adjuvant. The first injections were made intraperitoneally at one month interval. Three weeks later, a final intravenous boost was performed with 50µg of CMRL-1066 extracted EPS three days before the fusion with dilacerated spleen cells and SP2/O cells. Fusion and cloning were performed according to standard procedures (**Harlow & Lane, 1988**). The protocol (ref: CIRAD-12CBP001) was approved by the regional ethical committee. The hybridoma culture supernatants were screened using Mmm-EPS extract as a positive control and a sham extract from non inoculated PPLO-based broth and PPLO medium as negative control. Briefly, these extracts were spotted on nitrocellulose strips, incubated with the supernatants, washed and incubated with anti-mouse HRP conjugate (P0260 DAKO). After the final washing, the spots were then revealed with DAB (3-3' diaminobenzidine, SIGMA-ALDRICH)-Nickel chloride substrate (DAB 0,6mg/mL-NiCl 0,03%).

Another hybridoma cell line, "4.83" kept frozen in liquid nitrogen, was retrieved from a previous fusion for the production of *Mccp* recognizing MAbs (**Thiaucourt, et al., 1994**).

II.3.6. SDS-PAGE and western blotting

After culture in PPLO medium and incubation in CMRL-1066, mycoplasmas were pelleted and washed once in PBS. Aliquots of these pellets and supernatants were stored at -20°C. These samples and the extracted EPS were analyzed on denaturing polyacrylamide gel gradient 4 to 15% (Biorad 456-1083EDU) in 1x SDS, Tris, Glycine running buffer (Biorad 161-0732). After electrophoresis, protein and polysaccharidic detection was performed with Coomassie Brilliant Blue and PAS methods respectively. Immunodetection by western-blotting was performed after transfer to nitrocellulose membranes at 10V during 1h15 in 25mM Tris, 192 mM glycine, 10% methanol transfer buffer. Membranes were blocked with a solution containing 10% of horse serum in PBS. Then they were probed with Mabs 4.83 and 2.1.31, followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Detection was performed with DAB-NiCl₂ substrate.

II.3.7. Agar gel immunodiffusion test (AGID)

The test was performed according to Lemcke 1965 with minor modifications (Lemcke, 1965). The jellified medium consisted of Phytigel (Sigma P8169) at 0.4% with MgSO₄ at a final concentration of 0.1%. Once solidified, 3mm diameter wells were punched in the gel, with a 5mm distance between the center well and the external wells. The center well was filled with 30µl of the immune reagent, either a bovine serum from a field outbreak or with MAbs. External wells were filled with 30µl antigens. A culture of *Mmm* strain 8740-Rita was used as positive reference sample. Tested antigens consisted in crude culture, culture supernatant or extracted EPS. Plates were incubated at room temperature (21°+/-3) for 24 hours before being observed.

II.3.8. In silico analyses

Genes potentially involved in polysaccharides biosynthetic pathways were identified and retrieved by BLASTP similarity search (Altschul, *et al.*, 1997) within the molligen database (Barré, *et al.*, 2004) with genes already identified within *Mmm* genomes (Bertin, *et al.*, 2013) and a E-Value threshold of 10⁻⁸. Additional genes were identified by queries on annotated genes within the molligen database or through the Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy, <http://www.cazy.org/>).

CDS displaying a best blast hit (BBH) were retrieved and analyzed with the MEGA5 molecular evolutionary genetic tool package (**Tamura, et al.**, 2011). They were aligned with "Muscle" and a phylogenetic tree obtained using the distance/neighbor-joining method (**Saitou & Nei**, 1987), the gaps being considered as missing data. Bootstrap analyses were made with 1000 replicates (**Felsenstein**, 1985), bootstrap values under 90% were not considered as significant. When supported by significant bootstrap values, incongruence between protein and species phylogenies was considered indicative of a potential HGT. A tree with a housekeeping gene, *fusA*, was also build as a reference.

II.4.Results

II.4.1. Presence of EPS in extracts

The measured EPS content (**Table III.3**) shown that large amounts of EPS were produced by *Mmm* 8740, as expected, and *M. leachii* PG50. EPS production was lower for *Mccp* 95043. No measurement could be detected for *Mmc* serovar “capri” , *Mmc* serovar “LC” 95010, and *Mcc* California kid (Ckid) EPS extracts.

<u>Strain</u> <u>Designation</u>	<u>µg EPS/mL of</u> <u>CMRL</u>
8740	^a 47,5 +/- 0,4
95010	Nd
PG3	Nd
95043	^a 20,2 +/- 0,1
C. kid	Nd
PG50	^a 58,5 +/- 0,3

Table III.3: Quantities of EPS detected in extracts

^a : Data correspond to mean +/- standard deviation of several (>=3) experiments.

Nd : Not detected

II.4.2. Chemical characterization of EPS from *Mycoplasma mycoides* cluster by HPAEC and NMR

EPS detected by PAS method were subjected to a total acid hydrolysis with 4 M trifluoroacetic acid. HPAEC-PAD analysis of the acid hydrolysate revealed the presence of galactose as the only sugar for *Mmm* strain 8740 as described for *Mmm* strain Afadé. ¹H NMR spectrum of EPS for *Mmm* 8740 (**figure III.1B**) showed the same resonances as the spectrum obtained previously for *Mmm* Afadé (**figure III.1A**) and the 2D NMR spectra of the two EPS were very similar. These results indicated that the EPS for *Mmm* strain 8740 and for *Mmm* strain Afadé were both β-(1-6)-galactofuranose polymers.

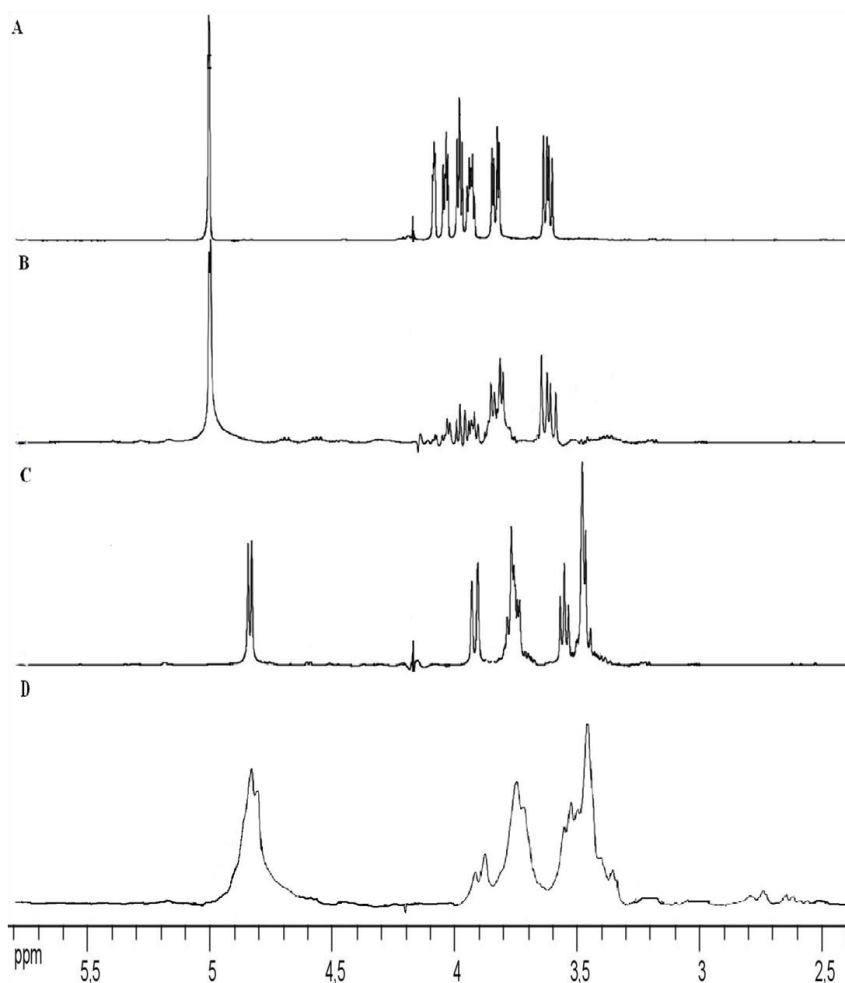


Figure III.1: ^1H NMR spectra of EPS produced by *Mmm* Afafé (A), *Mmm* 8740 (B), *Mccp* 95043 (C) and *M. leachii* PG50 (D).

The acid hydrolysate of EPS for *Mccp* 95043 and *M. leachii* PG50 showed that these polysaccharides were composed only by glucose. ^1H NMR spectra of these two polymers were presented in **figure III.1C** and **III.1D**. Five signals groups were observed and structural analyses of these two EPS were carried out by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. Correlations observed in 2D NMR COSY spectrum (**Figure III.2A**) permit to attribute the various chemicals shifts to proton of glucosyl residues: 4.873 (H-1), 3.575 (H-2), 3.793 (H-3), 3.477 (H-4), 3.503 (H-5), 3.774 (H-6) and 3.946 (H-6') ppm. On the 2D NMR HSQC spectrum (**figure III.2B**), the connectivities observed between H-1 and C-1 (103.26 ppm), H-2/C-2 (83.91 ppm), H-3/C-3 (76.82 ppm), H-4/C-4 (70.17 ppm), H-5/C-5 (77.47 ppm) and H-6, H-6'/C-6 (62.17 ppm) were characteristic of a glucan polymer. The H-1 signal at 4.873 ppm ($^1J = 7.83$ Hz) and C-1 at 103.26 ppm were typical of D-glucose residues with β pyranoside configuration. H-2

chemical values indicated the presence of a linkage on the C-2 in Glc residues. This linkage was confirmed by the presence of connectivities between H-1 of glucose (δ 4.873 ppm) and signal at δ 3.575 ppm belonging to H-2 of glucose. The connectivities were also observed in $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ spectrum. These results showed that EPS for Mccp 95043 and *M. leachii* PG50 were identical and composed of a β -(1-2) glucopyranose polymer. Only one signal for C-2 (83.91 ppm) was present in the ^{13}C spectrum. This is an indication that the polymer is linear as a cyclic β -(1-2)-glucan polymer would have yielded multiple signals (Choma A. and Komaniecka, 2003).

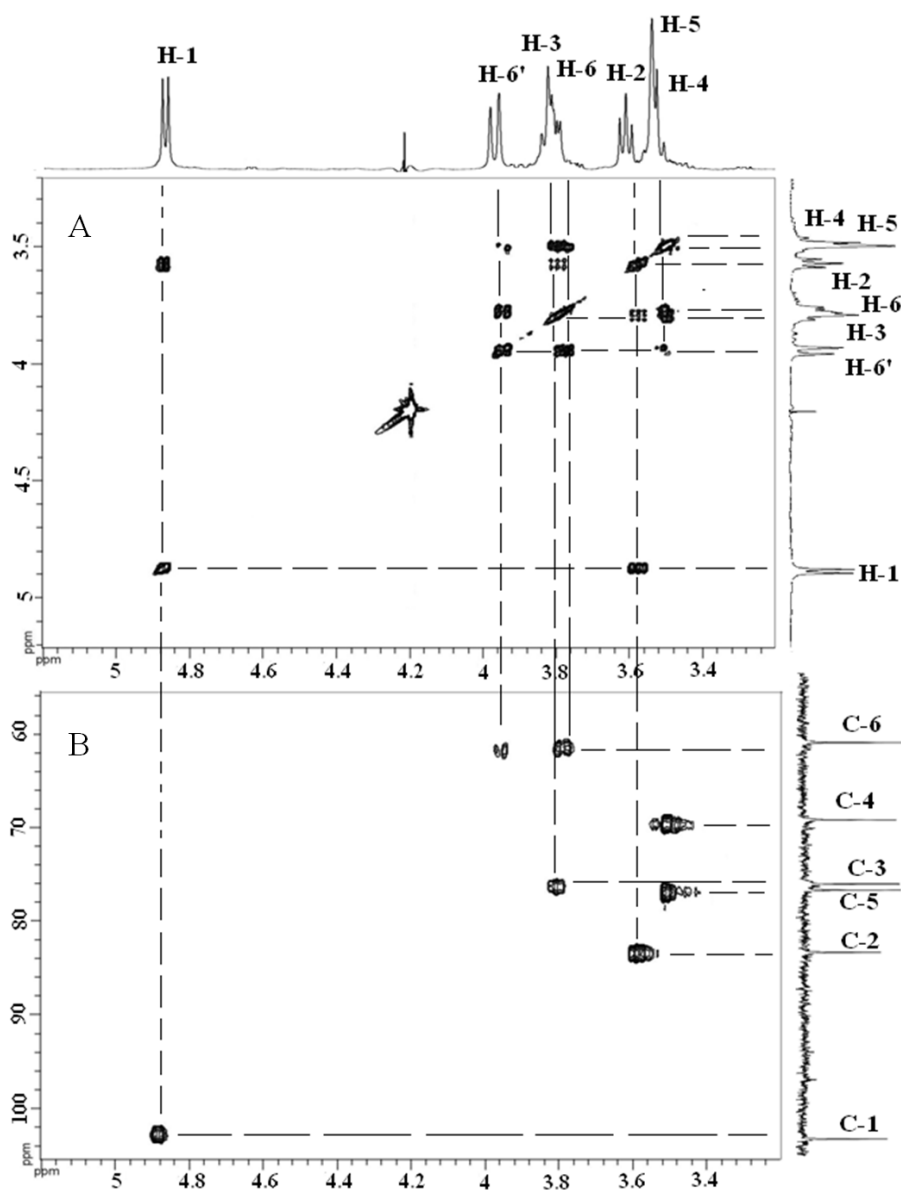


Figure III.2: 2D COSY NMR spectrum (A) and 2D HSQC NMR spectrum(B) of EPS produced by *M. leachii* strain PG50.

II.4.3. Generation of monoclonal antibodies against EPS of *Mmm* and *Mccp*

The Mabs 2.1.31 (IgG1) and 4.83 (IgM) were selected by dot blot analyses on nitrocellulose strips. They bound to extracted EPS and PPLO culture supernatants of *Mmm* 8740 and *Mccp* 95043 respectively but not to PPLO medium control (data not shown). Mycoplasmas, supernatants and EPS extracts of *Mmm* and *Mccp* were analysed by comparing SDS-PAGE profiles stained with Coomassie blue or PAS to western blotting analyses. Coomassie blue staining of washed mycoplasma pellets showed a typical protein banding pattern (**Figure III.3A**). Conversely, no protein was evidenced by this technique in the CMRL-1066 supernatant or EPS extract. The PAS staining of the gels revealed a positive smear of high molecular weight for the mycoplasma pellets (**Figure III.3B**), also detected with Mabs (data not shown). This corresponds certainly to the CPS. A similar smear was seen with the concentrated EPS while almost no color was seen with the CMRL-1066 supernatant, certainly because of the limited concentration of EPS in that sample. An additional band of apparent small molecular weight (10 kDa) was evidenced in the mycoplasma pellets only. Such a band may correspond to a glyco-lipid or a glyco-peptide product. These products were not recognized by the respective Mabs (data not shown). The western-blot results showed that the MAbs bound to a smear of high molecular weight, which corresponded to the smear shown with the PAS staining, confirming that the MABs are detecting EPS (**Figure III.3C**).

II.4.4. Immunological comparisons

Dot blots were performed with mycoplasma pellets, PPLO culture supernatants and extracted EPS from different MMC species and subspecies (**Table II.2**) using the two MABs (**Figure III.4**). As expected MAb 2.1.31 yielded a positive result for the three preparations of the *Mmm* strain 8740. Surprisingly, this MAb yielded a strong positive result with the pellet, a weaker positivity for the supernatant and no reaction for the EPS extract of strain *Mmc* 95010. No reaction was seen with any of the other strains/preparations with this MAb. Mab 4.83 reacted with the three preparations of the *M. leachii* PG50 and *Mccp* 95043 strains and none for the other strains/preparations, including the closely related *Mcc* Ckid.

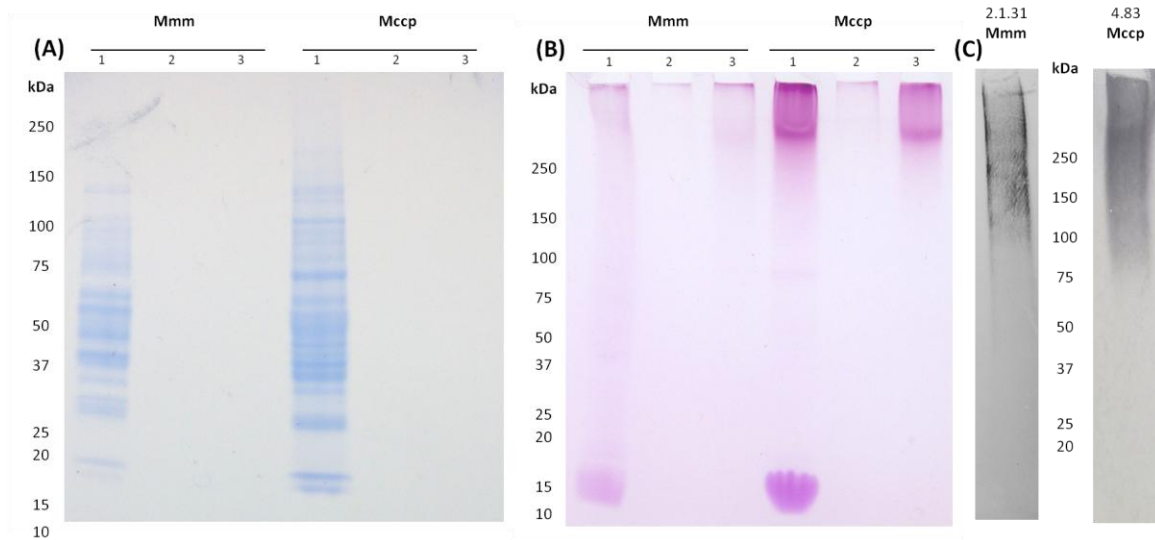


Figure III.3: Staining of *Mmm* and *Mccp* profiles with Coomassie blue (A) and Schiff's reagent (B) and immunodetections of their EPS by Mabs (C).

Three samples were analysed: washed mycoplasmas obtained after incubation during 80h in CMRL supplemented with 3g/L of glucose (lanes 1), supernatant after 80h of incubation (lanes 2) and extracted EPS from these supernatants (lanes 3). In (C) Western immunoblot analysis of EPS from *Mmm* and *Mccp* labeled respectively with Mab 2.1.31 and Mab 4.83.

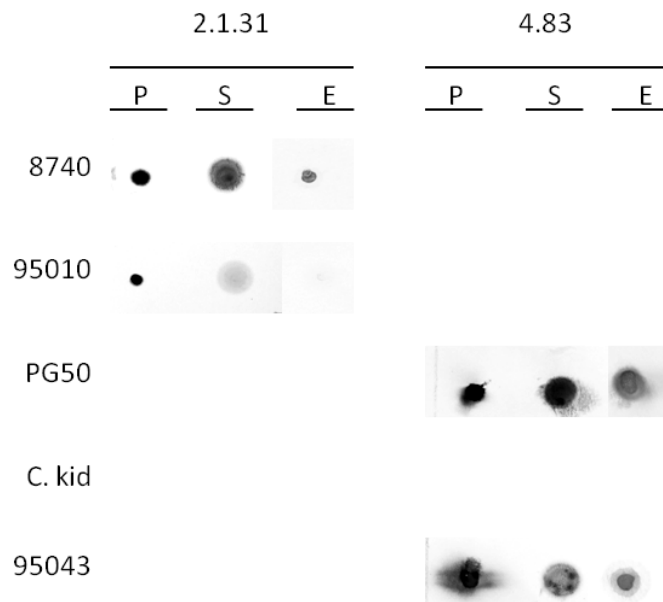


Figure III.4: Dot blot analysis of polysaccharides produced by MMC with Mabs 2.1.31 and 4.83

P: Pelleted mycoplasmas cells grown from PPLO medium, S: supernatants from PPLO culture, E: EPS extract.

Additional strains were included in the study to evaluate the intra-species variability, notably within *Mcc* strains or *Mmc* serovars “LC” and “capri” strains. For *Mcc* strains MAb 4.83 yielded positive results with all the pellets except for strain Ckid which appears to be an exception. Supernatants yielded also positive spots of variable intensities (**ANNEXE V-Figure S5**). MAb 2.1.31 recognized only *Mmc* strains belonging to the “LC” serovar. They all yielded a positive spot for the pellet and a very faint signal with the supernatant (**ANNEXE V-Figure S5**). Strains belonging to the serovar “capri” were not recognized by either MABs (data not shown).

We also performed immunological comparison by AGID. With the CBPP bovine field serum, two precipitation lines were observed with the positive reference antigen (*Mmm* 8740 crude culture) (**ANNEXE V-Figure S6**). Similar lines were observed when *Mmm* culture supernatant was used. However, inclusion of precipitated *Mmm* EPS resulted in a single line that was in the continuation of the line closest to the serum well in the case of *Mmm* culture. By comparison a single line was observed with the *Mmc* 95010 strain culture that was continuous with the *Mmm* EPS precipitation line. No precipitate was observed with *Mcc* strain 7714 and *Mmc* serovar “capri” strain PG3.

II.4.5. *In silico* analysis of EPS biosynthetic pathways in the MMC

Genes involved in glucose PTS transport system were identified in all the genomes studied. All but one gene (MSC_0054) identified in the genome of *Mmm* strain PG1 were also identified in the genome of *Mmc* serovar LC strain 95010 (**Figure III.5**). This result highlighted again a closer relationship among *Mmm* and the LC serovar of *Mmc* in regard to polysaccharide synthesis. The peculiarity of the *Mmm* genome relied in the duplications that affected many of these genes. For the sake of clarity we chose to base the comparisons on the genes identified in strain 95010 genome as fewer duplications were observed.

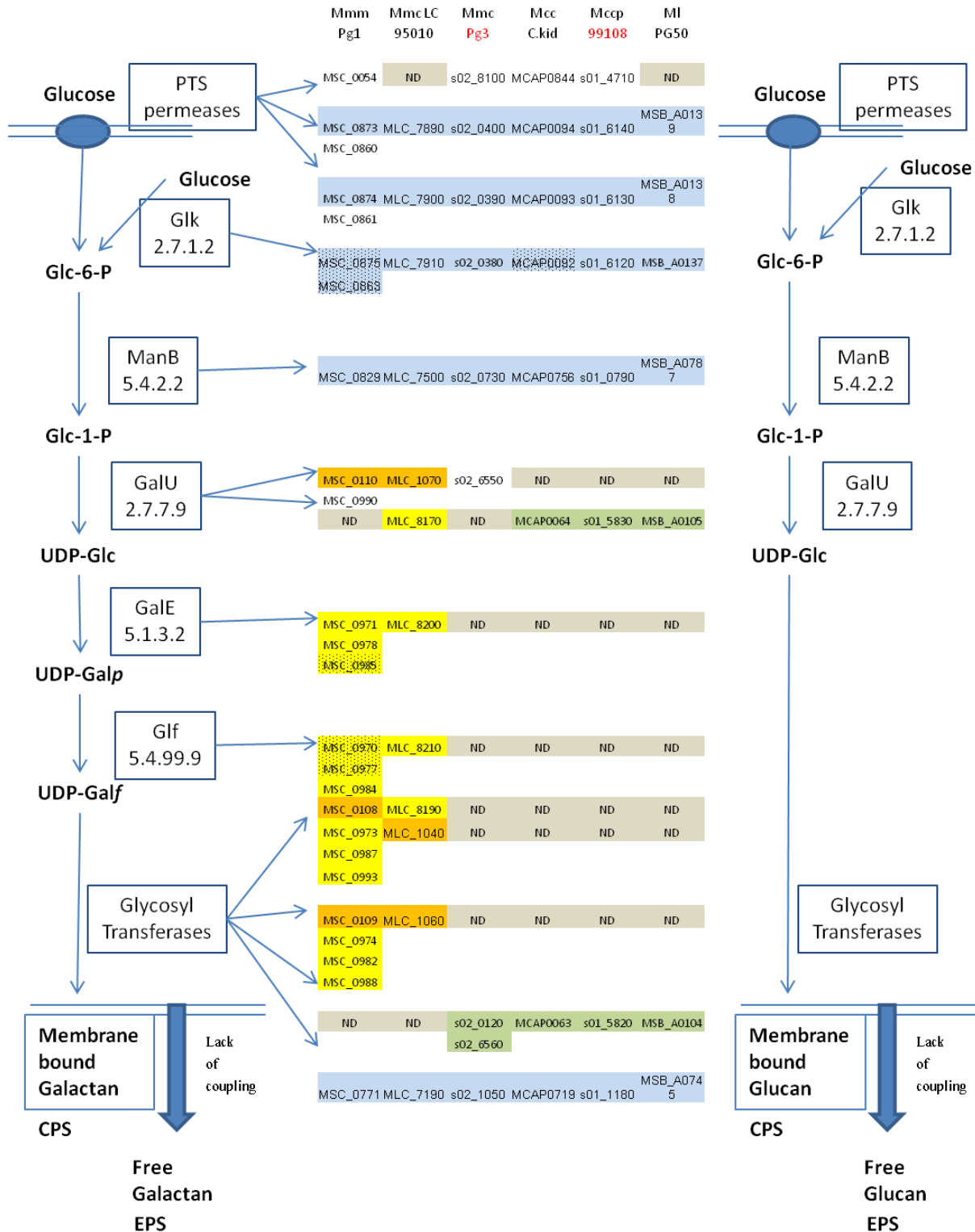


Figure III.5: Overview of the exopolysaccharide synthesis pathway in the *Mycoplasma mycoides* cluster.

The various genes involved in this pathway are represented on the left side for *Mmm* and *Mmc* serovar "LC" and on the right side for *M. capricolum* subspecies and *M. leachii*. Locus tag numbers are mentioned for a representative genome for each of the species. Genes highlighted in blue were acquired vertically. Others were acquired horizontally. Highlighted genes in green, orange and yellow correspond to genes found in clusters. Genes that show the highest similarity level within the MMC are positioned on the same line. Pseudogenes are represented on a spotted background. (ND: not detected)

BLASTP analyses revealed that there was a set of genes common to the whole MMC. For each of these genes, similarity values reflected phylogenetic distances among members of the "Spiroplasma Entomoplasma Mycoides" (SEM) clade based on 16S rRNA genes or other well conserved housekeeping genes such as *fusA*: by decreasing similarity values *Mmc*; *Mmm*; *M. leachii*; *Mcc*; *Mccp*; *M. putrefaciens*; *M. yeatsii*; *M. florum*; *S. melliferum*. Examples of phylogenetic reconstruction for such gene products are given for *fusA* and *manB* (**ANNEXE V-Figure S7**). This set of genes reflects the evolution of the "SEM clade" from a common ancestor and it comprises: a glucose phosphotransport system (*ptsG*, MLC_7890) a transmembrane conserved hypothetical protein (*CHP*, MLC_7900) a glucokinase (*glk*, MLC_7910) a phosphoglucomutase (*manB*, MLC_7500) and a glycosyltransferase (*cps*, MLC_7190). The latter gene (*cps*, MLC_7910) is somewhat peculiar as the BLASTP analysis did not detect any homologue outside the MMC at the specified E-Value threshold.

By contrast, there was another cluster of genes that was present only in *Mmm* and a subset of *Mmc* serovar "LC" but absent from all the other members of the MMC including from the *Mmc* reference strain PG3 genome. This cluster included an UDP-glucose epimerase (*galE*, MLC_8200) an UDP-galactopyranose mutase (*glf*, MLC_8210) and two glycosyltransferases (*epsG*, MLC_8190, duplicated as MLC_1040, and *cps*, MLC_1060). Phylogenetic reconstruction showed that these genes grouped together with genes from Mycoplasmas belonging to the "M hominis group" such as *M. bovis genitalium*, *M. fermentans* (**GalE, ANNEXE V-Figure S7**). This proximity and the absence of ancestors to these genes in the rest of the MMC or even the "spiroplasma group" could be a sign of an horizontal transfer for this cluster of genes.

Other genes were also present in a limited number of species from the MMC, a sign of possible horizontal gene transfer and/or deletions. Two UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase genes were identified in the strain 95010 genome (*galU*, MLC_8170 and MLC_1070). The two genes did not result from a recent duplication as their similarity value was only 84%. Each copy seemed phylogenetically closer to *galU* genes found in *capricolum* strains (MLC_8170) or in mycoides strains (MLC_1070) but none had any homologue within the SEM clade. The closest relatives were found in Achleoplasmas (**GalU, ANNEXE V-Figure S7**) or in other mycoplasma clades.

A group II glycosyltransferase (GT2, MCAP0063) was observed only in species very closely related to *Mcc* (*Mcc*, *Mccp*, *M. leachii*, *Mmc* serovar “capri”) but neither in *Mmm* and *Mmc* serovar “LC” nor in the other members of the SEM clade. The closest relatives were found in *M. bovis* and *M. agalactiae*, again a sign of horizontal gene transfer.

A schematic representation of the spiroplasma group phylogeny and HGT events impacting EPS phenotypes for the MMC is presented in **ANNEXE V-Figure S8**.

Among the identified glycosyltransferases, only one was common to the whole MMC (MLC_7190). It was flanked upstream by genes coding a putative lipoprotein (with a DUF 285 motif) and a peptide methionine sulfoxide reductase MsrA/MsrB (MsrA). Downstream it was flanked by a conserved hypothetical protein gene, with four predicted transmembrane segments and by an RDD motif, and an ATP-dependent DNA helicase (*pcrA*). This synteny was also conserved among all the members of the MMC (**Figure III.6**). The lipoprotein gene was duplicated for *Mcc* Ckid. The functions of the two genes flanking directly this glycosyltransferase are not known. The RDD motif (arginine aspartate aspartate) of the transmembrane protein (MLC_7180) may be associated with a transport activity. Interestingly the *lpp* gene upstream the glycosyltransferase was interrupted by frameshift mutations in some species of the MMC: *Mmm*, *M. leachii* and *Mccp*. These three species are those that have been shown to secrete polysaccharides.

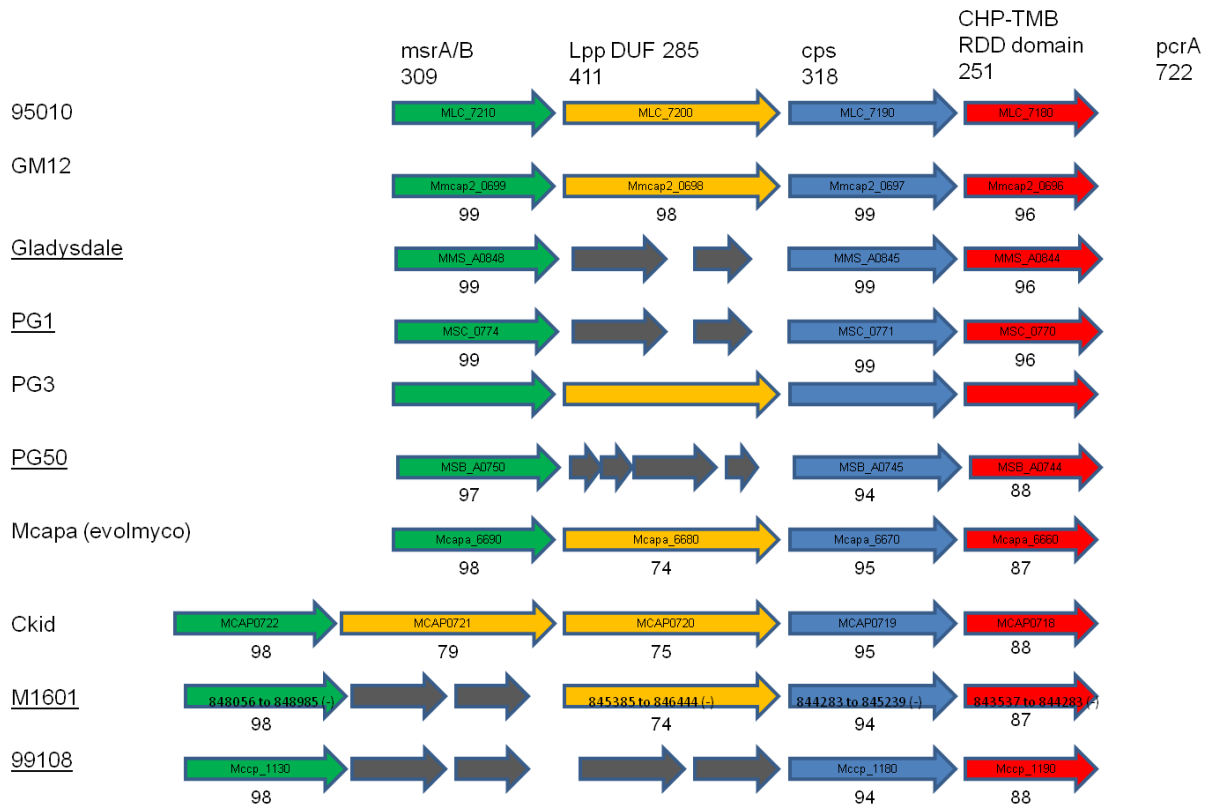


Figure III.6: Synteny of the gene cluster surrounding a type II glycosyltransferase in the *Mycoplasma mycoides* cluster.

The cluster of genes found in *Mmc* serovar LC strain 95010 genome has been chosen as the reference. Gene names and AA numbers are indicated on top. The names of strains are indicated on the left, underlines names correspond to strains where EPS is detected. The figures under the genes are referring to similarity values to the reference *Mmc* serovar LC genes.

The lipoprotein with a DUF285 motif found upstream the glycosyltransferase is duplicated in some *M. capricolum* strains, including the *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* strains. There is a strict correlation between EPS secreting strains and the presence of a pseudogenized lipoprotein gene.

III.DISCUSSION

III.1. EPS composition

Members of the MMC appeared diverse in terms of polysaccharide production and secretion in spite of their very close phylogenetic relationship. Two different polysaccharide products were detected and strains differed in their capacity to produce and/or secrete these compounds.

Galactan, a galactofuranose homopolymer, was detected as a CPS and EPS in *Mmm* strains. The same compound was detected with the galactan-specific MAb in *Mmc* serovar LC strains as a CPS, in the cell pellet, but not as an EPS, in the supernatant. No galactan was detected in *Mmc* serovar “capri” strains by the MAb and no EPS detected by NMR. This may account for the association of *Mmc* serovar LC and *Mmm* strains differentiated from other *Mmc* strains in the growth inhibition techniques (**Al-Aubaidi, et al.**, 1972) as EPS is an immunogenic product. This absence of galactan in *Mmc* serovar “capri” had already been noticed when the chemical composition of the nucleic acids and macromolecular components was studied (**Jones, et al.**, 1965). The only polysaccharidic molecule detected in the reference PG3^T strain was a lypoglycan composed of glucose in very small amount, 0,5% of the dry weight, when galactan was representing 10% of the dry weight of *Mmm*.

A linear β -D-(1,2) glucan homopolymer, was detected as CPS and EPS in *Mccp* and *M. leachii*. This composition differs from what had been already described for *Mccp* strains (**Rurangirwa, et al.**, 1987a). In that study, the monosaccharide components of the *Mccp*-EPS were identified as glucose, galactose, mannose, fucose, N-acetyl-D-galactosamine and N-acetyl-D-glucosamine. The difference with the results of this study may be attributed to the crude preparations used in 1987 to precipitate the polysaccharide from the culture supernatant. These preparations were most probably contaminated by polysaccharides present in the very rich medium needed to grow Mycoplasma strains. Concerning the linear structure of this glucan, similar structures are rare in bacteria. Very short linear β -D-(1,2) glucan were evidenced in the periplasm of *E. coli* and tropical *Rhizobium* species (**Geiger, et al.**, 1991) (**Weissborn, et al.**, 1992). Nevertheless, cyclic structures, found in the *Mesorhizobium* species (**Choma & Komaniecka**, 2003, **Kawaharada, et al.**, 2008) as well as

Brucella (**Guidolin, et al.**, 2009), are more frequent. The cyclic compounds found in *Brucella* may be required for intracellular survival (**Arellano-Reynoso, et al.**, 2005) as they prevent phagosome-lysosome fusion. The strains belonging to *Mcc* exhibited heterogeneous polysaccharide profiles when tested with the MAb 4.83. No polysaccharide was detected in the reference strain Ckid, while the other strains yielded positive results for CPS but EPS and others for CPS and EPS. This highlights the fact that reference strains, which have been subjected to numerous in vitro passages, may not accurately represent the species. Therefore field strains should be preferred for physiology and genetic studies.

III.2. *In silico* analysis of EPS biosynthetic pathways in the MMC

Among all the genes that are possibly involved in CPS or EPS synthesis in the MMC, there was a group of genes that has been acquired by vertical transmission. Their phylogeny reflected the general phylogeny of the SEM group. These genes are involved in the pathway for the production of Glc-1-P and they also include a glycosyltransferase. Owing to their conservation, these genes may be involved in the formation of diglycosyldiacylglycerol which is a bilayer forming glycolipid and, as such, participate to the stability of the mycoplasma membrane (**Andrés, et al.**, 2012). Such an activity for a glycosyltransferase has been demonstrated in *M. pneumoniae* (MPN483, (**Klement, et al.**, 2007)) and *M. genitalium* (MG517, (**Andrés, et al.**, 2011)).

By contrast, phylogenetic analyses suggested that all the other genes involved in polysaccharide production may have been acquired by HGT. The importance of this mode of gene acquisition has been recognized only recently in mycoplasmas (**Sirand-Pugnet, et al.**, 2007a). The comparison of the *M. agalactiae* PG2 genome and that of *Mmm* PG1 genome had revealed a number of HGT events for these two species which are distant from a phylogenetic point of view but share the same habitat, the ruminant hosts. Various types of genes were involved in HGT, many with unknown functions, including some surface exposed lipoproteins, but also genes involved in transport molecules (glycerol transport, oligopeptide transport for example).

Polysaccharide synthesis genes must be added to the list of genes that can be exchanged by HGT in mycoplasmas. This is no exception to other prokaryotes, as CPS and EPS synthesis genes are often carried by mobile genetic elements such as plasmids in lactococci (**Forde & Fitzgerald, 2003**) or are closely associated with insertion sequences (IS) for example in *Desulfobibrio* (**Walker, et al., 2009**) or *Lactococcus* (**Dabour & LaPointe, 2005**).

Polysaccharides genes HGT in the MMC could well be associated with such mobile genetic elements which are very often detected in their vicinity. Integrative conjugative elements (ICE) are other mobile genetic elements which have been pinpointed as responsible for HGT events (**Sirand-Pugnet, et al., 2007b**). For example in the *M. mycoides* species the "galU-epsG-galE-glf-" cluster is followed by an IS1296 in the *Mmc* serovar LC GM12 genome (CP001621). The duplications of this cluster in the *Mmm* genomes are also associated with IS elements (IS1634 or ISMmy1) and the mycoides-similar glf and galE genes in the *M. bovis genitalium* genome (**Manso-Silvan, et al., 2013**) are found in the vicinity of an ICE (WP_004419884).

Apart from *Mmm* and *Mmc* serovar LC strains, the other members of the MMC did not acquire the galE-glf-epsG genes which account for the synthesis of galactan. However they did acquire a galU and a glycosyltransferase (MSB_A0104 and MSB_A0105 respectively in the PG50 genome) by HGT as the most similar orthologues (71% similarity) were found in *M. agalactiae* and *M. bovis* while no homologous gene was found in the SEM group. These two genes may be involved in the synthesis of UDP-Glc and the polymerization of β -(1-2) glucopyranose that was detected in *Mccp* and *M. leachii* with MAb 4.83.

In a previous study, we have shown that a clonal population of *Mmm* presents variations in its galactan production (**Bertin, et al., 2013**). Indeed, *Mmm* has the capacity to switch between capsular galactan and free galactan form. This capacity is linked to the expression of the PTS-G permease MSC_0860/0873 and *Mmm*, cultured on agar plates, presents related opacity phenotypes. *M. leachii* has shown similar colony phenotypes (data not shown).

Futhermore, we observed a strict correlation between the secretion of EPS in *Mmm*, *M. leachii* and *Mccp* and the presence of a lipoprotein pseudogene immediately upstream the conserved glycosyltransferase (MLC_7190). This was not a strain specific event as this pseudogene was observed in all the strains tested for each species as a signature (*Mmm* N=8, *MI* N=2, *Mccp* N=2, rests not shown). This could suggest that this lipoprotein is involved in a function linked to CPS synthesis like transport across the membrane and attachment of the polysaccharide moiety to the lipid anchored moiety.

As the EPS found in *Mccp* and *Mmm* were also identified in other species or subspecies of the MMC the specificity of the diagnostic tests based on these EPS may be questioned. For the detection of CBPP in bovines this should not be a problem as bovines are very rarely infected with MMC strains. However the surveillance of CCPP in goats based on EPS tests (**March, et al.**, 2000) (**Rurangirwa, et al.**, 1987b) may be jeopardized by the frequent infections with MMC strains and notably *Mcc* that is likely to yield false positive results. In France, between 2003 and 2008, *Mcc* strains represented 26% of the mycoplasma isolates found in goats (**Chazel, et al.**, 2010).

IV.Conclusions and perspectives:

The chemical composition and possible synthesis pathways for the secreted polysaccharides of the MMC have now been determined. This was a preliminary step to explore what could be the role of these products. Typically polysaccharides play a role in bacterial adaptation to different stress conditions, being involved in their survival in the environment or the establishment of symbiotic or pathogenic relationships with the hosts they colonize (**Ferreira, et al.**, 2011). For example, CPS may play a protective role for the bacteria in the resistance to desiccation and heat or resistance to metal ion stress. CPS may also be considered as a virulence factor through adherence to some cells or tissues, resistance to antimicrobial peptides, and interference with the innate immune system response. This interference may result from the masking of some bacterial surface components, interference with neutrophyl chemotaxis, scavenging of reactive oxygen

species or interaction with pattern recognition receptors in macrophages or dendritic cells that will activate the first steps of the innate and inflammatory response (**Kingeter & Lin, 2012**). In the case of the MMC mycoplasmas, the polysaccharides are present either in the form of CPS or, for some strains, they can also be secreted as a free form due to a variation mechanism for *Mmm*. The hypothesis of such variation mechanism needs to be investigated for *M. leachii* and also for *Mccp*. Additional studies are also needed to determine the relative importance of CPS and EPS in the virulence of these strains. Clearly the nature of the secreted polysaccharide does not seem to correlate with the host or a specific organ as *Mccp* and *M. leachii*, which secrete the same compound, are found in goat lungs and bovine joints or udders respectively.

Once the infection has been installed, the role of the adaptative response towards the polysaccharides will have to be studied. This response may well be detrimental. In the case of CBPP, IgM antibodies directed towards a circulating antigen may lead to the formation of immune complexes that precipitate and induce renal infarcti seen in the acute phase of the disease (**Provost, 1987**). In addition, the cross-reactions with some of the host antigens (**Gourlay & Shifrine, 1966**) may trigger some auto-immune responses. This adaptative response could also be protective. Most of studies focused on isolated bacterial polysaccharides which are not processed to generate MHC class II complexes on the surface of antigen presenting cells. However, the mechanisms underlying *in vivo* polysaccharide-specific immunoglobulin responses may be more complex (**Snapper, 2012**). *In vivo*, polysaccharides are presented to the immune system as a soluble product, a T independent antigen, as well as polysaccharide coupled to diglycosyldiacylglycerol residues which may trigger a T dependant immune response. Understanding the parameters that regulate the expression of polysaccharides in the mycoplasma and the modulation of immune response of the host is a key issue for the development of new vaccines. This would help determining if polysaccharide targeted immune responses could lead to protection or, at the contrary, would exacerbate the disease.

V. Points de conclusion du chapitre III

- Deux polysaccharides sont produits par les membres du groupe «mycoides». *Mmm* et *Mmc* sérovar « LC » produisent un homopolymère de β -(1-6) galactofuranose tandis que *Mcc*, *Mccp* et *M.leachii* un homopolymère de β -(1-2) galactopyranose. Aucun EPS n'a été détecté pour *Mmc* sérovar « capri » et il n'est reconnu par aucun des deux Mabs.
- Les mycoplasmes du groupe «mycoides» présentent une hétérogénéité entre les espèces qui sécrètent les polysaccharides sous forme CPS et EPS (*Mmm*, *Mccp* et *M. leachii*) et celles qui ne produisent que la forme CPS (*Mmc* sérovar LC et *Mcc*). Cette hétérogénéité va jusqu'à se ressentir au sein d'une même espèce (*Mmc* et *Mcc*).
- Les voies de biosynthèse déterminées par les analyses *in silico* sont en accord avec les polysaccharides produits.
- Les analyses de phylogénie suggèrent que les gènes imputés à la biosynthèse du galactane et du glucane ont été acquis par HGT.



CHAPITRE IV

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

I. Conclusions générales

Depuis de nombreuses années, la production d'EPS par certains mycoplasmes du groupe «mycoides», et en particulier *Mmm*, était un fait avéré sans que ces composés n'aient jamais pu être caractérisés. Le transfert des mycoplasmes en culture dans un milieu synthétique nous a permis de produire, d'isoler et de concentrer leurs polysaccharides libres à partir des surnageants de culture, tout en nous affranchissant des contaminants du milieu. La caractérisation de ces EPS a été rendue possible grâce à l'utilisation de techniques telles que la RMN. Le développement d'outils immunologiques spécifiques que sont les anticorps monoclonaux a offert le moyen de détecter les polysaccharides sous forme CPS et EPS et, ainsi, un moyen rapide d'identifier les souches ou espèces productrices et la ou les formes du polysaccharide qu'elles produisent. Enfin, la disponibilité de séquences génomiques complètes et annotées des espèces de mycoplasmes du groupe « mycoides » nous a fourni la possibilité d'identifier les gènes impliqués dans la synthèse des polysaccharides.

Deux polysaccharides ont été identifiés et leur structure caractérisée : *Mmm* et *Mmc* sérovar « LC » produisent un polysaccharide composé de β -(1-6) galactofuranose et *Mcc*, *Mccp* et *M. leachii* de β -(1-2) glucopyranose. De surcroît, *Mmm*, *Mccp* et *M. leachii* sont capables de synthétiser le polymère sous forme CPS et EPS alors que *Mmc* sérovar « LC » et *Mcc* n'arborent que la forme capsulaire du composé, hormis quelques exceptions concernant *Mcc*. Au vu des communautés polysaccharidiques entre des espèces infectant des hôtes différents, ces composés ne sont donc *a priori* pas liés à la spécificité d'hôte.

Nous avons démontré que les EPS de *Mmm* se composent de sous-unités galactofuranoses liées en β -(1-6), soit, exactement la même structure que le CPS qui était déjà caractérisé, excepté qu'aucune ancre lipidique n'est détectée pour les EPS. La plupart des gènes impliqués dans la biosynthèse du galactane sont organisés en clusters présents en copies multiples dans le génome. De plus, la comparaison entre deux séquences génomiques complètes (PG1^T et Gladysdale) montre que le nombre de copies d'un gène, ou cluster de gènes, est variable d'une souche à une autre. A titre d'exemple, le gène *cps* (MSC_771) est retrouvé quatre fois dans le génome de la souche PG1^T alors qu'il serait représenté six fois dans le génome de la souche Gladysdale. Par ailleurs, les gènes copiés peuvent l'être intégralement ou sous forme de pseudo-gène, notamment en raison de leur interruption par

des séquences d'insertion. Cette configuration génétique explique, en plus de la faible couverture du génome par la banque, notre échec dans l'obtention d'un mutant déficient dans la production de galactane.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence, pour *Mmm*, que des variants intraclonaux diffèrent dans la production de galactane. Cette oscillation est liée à l'expression de la perméase PTS MSC_0860/0873 dédiée au transport de glucose. Les variants présentant des colonies opaques ont une capsule de galactane et n'expriment pas la perméase alors que les variants producteurs de colonies translucides sécrètent le galactane sous forme d'EPS libres dans le milieu et expriment la perméase. Ce phénomène d'oscillation est-il le fruit du hasard ou bien est-il régi par de fins mécanismes de régulation ? A-t-il un impact sur la virulence de la bactérie ? Il est à noter que ce phénotype d'opacité des colonies a été remarqué chez *M. leachii*. Toutefois, il reste à démontrer si ce type de variation est un phénomène universel chez toutes les espèces produisant de l'EPS, y compris chez *Mccp*.

Il s'avère que des souches de *Mmc* sérovar « LC » produisent également du galactane. Néanmoins, elles le synthétisent uniquement sous-forme CPS, de même pour le glucane synthétisé par *Mcc*. Au demeurant, les trois espèces produisant un EPS libre (*Mmm*, *M. leachii* et *Mccp*) possèdent la même signature : la pseudogénisation d'un gène codant une lipoprotéine de fonction inconnue et présent en amont de la GT MLC_7190, conservée au sein du groupe « mycoides ». Les gènes de *Mmc* sérovar « LC », impliqués la synthèse du galactane sont organisés en cluster mais présent en copie unique, comme c'est le cas pour *Mmm*. La sécrétion d'une forme libre chez *Mmm* est-elle alors issue d'un phénomène actif ou résulte-t-elle d'un défaut de couplage entre le galactane et le lipide accepteur ? Les arguments énoncés dans le chapitre II, à savoir, la présence d'une synthase ne nécessitant pas de molécule acceptrice (MSC_0108), semblent favoriser la première hypothèse.

Les analyses phylogénétiques menées sur les gènes impliqués dans la synthèse des polysaccharides soutiennent fortement l'hypothèse d'un évènement de transfert latéral/horizontal de gènes pour certains d'entre eux. La forte similarité avec des gènes présents chez *M. bovis genitalium* suggère que ces échanges auraient pu avoir lieu à la faveur d'une co-infection chez un même hôte, en l'occurrence ici un bovin. Les mécanismes en jeu dans ces transferts latéraux de gènes restent à démontrer et l'implication d'éléments

mobiles comme les séquences d'insertion ou les éléments conjugatifs intégratifs est probable.

Mmc sérovar « capri », dont le pouvoir pathogène ne diffère pas significativement de celui du sérovar « LC », ne produit pas de galactane que ce soit sous forme CPS ou EPS et aucun autre EPS n'est détecté. Ce résultat remet en cause l'implication directe du galactane dans la virulence. Cependant, les analyses chimiques ont été réalisées avec la souche type, PG3^T, ayant subi de nombreux passages in vitro. Cela a pu entraîner une dérive génétique et cette souche n'est peut-être pas représentative. Pourtant, aucun des deux polysaccharides identifiés dans cette étude n'a été détecté par les Mabs correspondant chez les autres souches testées alors que les études antérieures relatent la présence d'un LPG composé de glucose pour la souche PG3. La structure de ce LPG ainsi que sa production potentielle en tant que CPS voire EPS, chez d'autres souches que PG3^T, demanderaient à être explorés.

Le polysaccharide composé de sous-unités β -(1-2) glucopyranose est produit aussi bien par *Mcc* et *Mccp* que par *M. leachii*. Concernant *Mccp*, cela a été une réelle surprise puisqu'un polysaccharide de composition totalement différente avait été décrit précédemment pour cette espèce. Ce composé possède un enchainement linéaire, ce qui constitue une structure peu fréquente pour ce type de liaisons osidiques dans le monde bactérien. Par ailleurs, les analyses phylogénétiques menées sur les gènes impliqués dans la biosynthèse du glucane, pour les trois espèces/sous-espèces productrices, vont également dans le sens d'une acquisition des gènes par HGT avec des similarités génétiques allant jusqu'à 70% avec *M. agalactiae* et *M. bovis*.

II. Perspectives

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse ouvrent maintenant la voie à d'autres études qui peuvent éventuellement se regrouper en quatre grandes orientations.

Tout d'abord la mise en évidence de communautés chimiques et immunologiques entre les EPS du groupe mycoides doit ouvrir la voie à des **études très concrètes sur les tests de diagnostic déjà existants ou qui pourraient être développés**. Il convient notamment de vérifier la plus ou moins grande spécificité des tests basés sur le glucane de *Mccp* avec les croisements possibles lors d'infection à *Mcc* (hôtes caprins) ou en vue de diagnostiquer une infection à *M. leachii* (hôtes bovins).

La détermination de la nature des composés produits par les mycoplasmes du groupe « mycoides » ouvre la voie à des travaux plus ambitieux qui permettraient de **caractériser la biodiversité des polysaccharides mycoplasmiques**. La méthodologie utilisée au cours de cette thèse pour concentrer des EPS et se débarrasser des contaminants du milieu s'étant avérée reproductible, elle pourrait être utilisée sur un panel plus élargi de mycoplasmes. De même, l'isolement des CPS donnerait l'opportunité de les caractériser chimiquement et d'évaluer le ratio CPS/masse mycoplasmique. Cela permettrait ainsi de savoir, entre autres, si d'autres pathogènes de ruminants produisent des EPS en dehors du groupe « mycoides » et si la communauté structurale CPS/EPS pour une même espèce est universelle ou bien une particularité de ce groupe. En parallèle des caractérisations chimiques, des analyses approfondies des génomes de mycoplasmes seraient à prévoir. Une des avancées majeures de la biologie au cours de ces dernières années a été l'avènement des techniques de séquençage massif avec, en corolaire, le développement de plateformes d'assemblage des génomes et d'annotation fonctionnelle de ceux-ci. Il est donc maintenant possible de réaliser un inventaire global de tous les gènes voire clusters de gènes potentiellement impliqués dans la synthèse des polysaccharides. *In fine*, cela permettrait également de vérifier si les phénomènes de transferts latéraux de gènes participent activement au maintien ou au développement de la biodiversité en matière de polysaccharides chez les

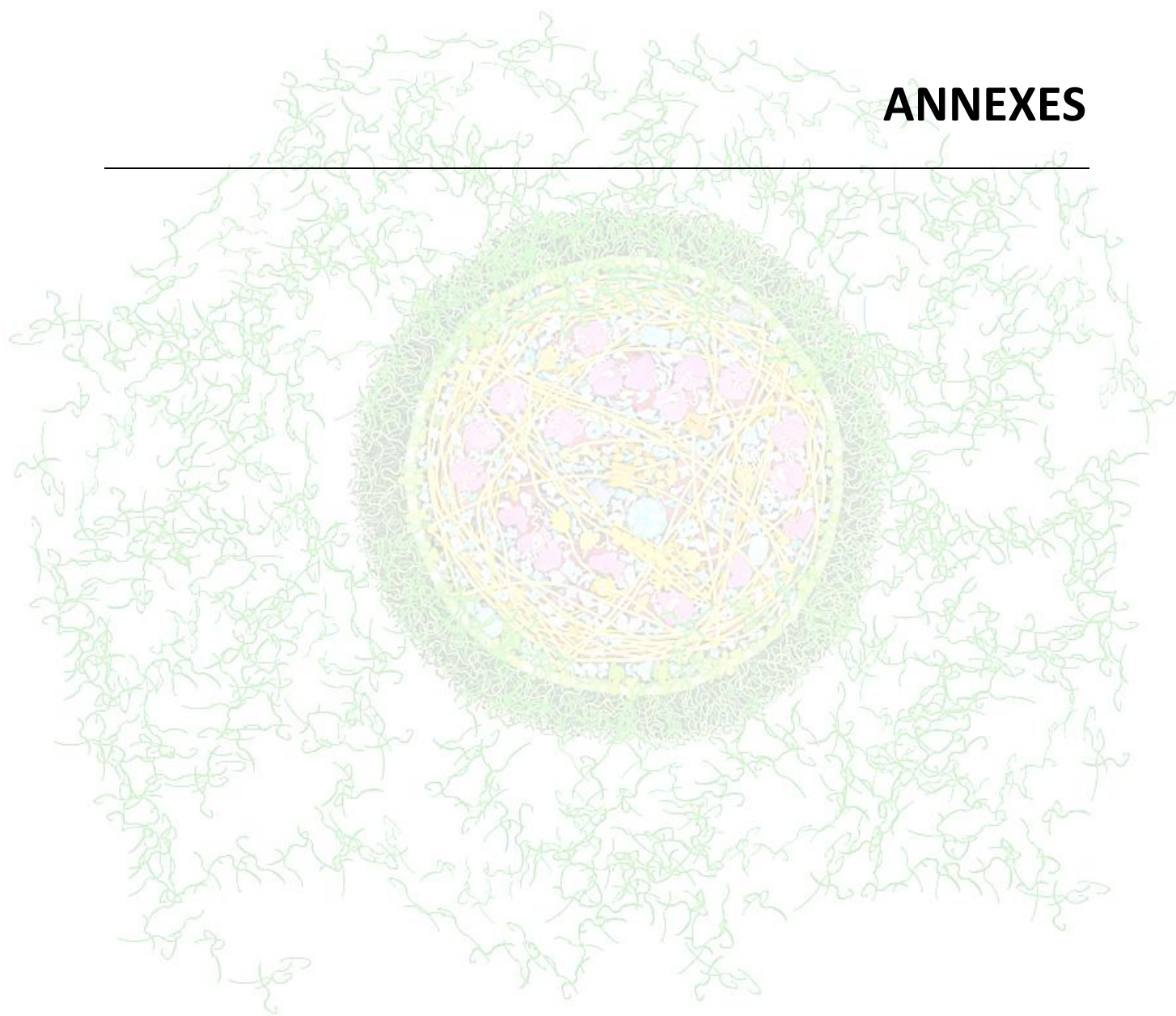
mycoplasmes. Au cours de notre étude nous avons pu noter des communautés génétiques avec d'autres groupes de mycoplasmes. Cela suggère que les flux de gènes pourraient se réaliser préférentiellement entre ces bactéries à la faveur d'une co-infection chez un hôte. Il serait donc intéressant de se pencher sur l'origine de ces flux.

Un des objectifs que nous nous étions fixés au cours de cette thèse, et qui n'a pu être réalisé, était d'apporter **une preuve fonctionnelle de l'implication de certains gènes dans la biosynthèse des polysaccharides**. Cet objectif mériterait certainement d'être repris afin de décrypter les mécanismes soupçonnés d'être impliqués. Le modèle que nous avons choisi, *Mmm*, l'avait été sur la base de son importance en tant qu'agent causal d'une maladie d'importance mondiale. Etant donné les phénomènes d'oscillation et les duplications génétiques auxquels nous sommes confrontés, le nouveau modèle devrait être choisi sur des critères purement microbiologiques et génétiques avec des souches se cultivant facilement, ne posant pas de risque de biosécurité et présentant un génome sans duplications. Une souche de l'espèce *Mmc* sérovar « LC » correspondrait à ces critères notamment en vue de la création d'une nouvelle banque de mutants insertionnels. Les Mabs anti-galactane développés serviraient à isoler, sans *a priori*, un, voire des mutant(s) déficient(s) dans la production de galactane. Par la suite, des comparaisons entre souche sauvage et mutants pourraient être entreprises par des approches de transcriptomique et de protéomique afin de percevoir les interactions et/ou régulations qui interviennent selon des paramètres définis tels que la disponibilité du glucose dans le milieu ou encore la co-culture avec des cellules de l'hôte. En l'occurrence, l'obtention d'un mutant délété sur le gène codant la perméase, imputée aux variations de la production de polysaccharides, serait idéal pour ces expériences et pourrait contribuer à des études de virulence.

Enfin, un objectif qui constitue une suite logique aux études fonctionnelles et une évidence suite aux nombreuses pistes et questions qui se posent : **décrypter les rôles biologiques des polysaccharides et notamment au niveau des interactions avec les hôtes que les mycoplasmes colonisent**. En effet, ces rôles sont très loin d'avoir été explicités. Dans ce cas également, l'obtention de mutants serait d'une grande utilité pour comparer des souches avec un même fond génétique et ne différant que sur leur capacité à produire des

polysaccharides. Trois types de rôles biologiques se distinguent. En premier lieu, un rôle assez général lié à la résistance dans le milieu extérieur et la résistance à la dessiccation notamment est à élucider. Cependant, pour des espèces qui sont des agents pathogènes reconnus, l'interaction de ces polysaccharides avec l'hôte colonisé et son système immunitaire est sans doute plus fondamentale. A ce niveau, il faudra certainement s'intéresser aux interactions initiales et les défenses innées de l'organisme avec la capacité à résister à la phagocytose et à la lyse par le complément. Mais il faudra aussi analyser quelles sont les voies de signalisation qui sont stimulées notamment au niveau des Récepteurs de type Toll (ou Toll like récepteurs) et si les réponses induites par ces CPS ou EPS jouent un rôle dans le développement de l'inflammation aiguë initiale observée au cours des infections dues à des mycoplasmes du groupe « mycoides ». Par ailleurs, il est clair que les animaux infectés développent des réponses immunologiques spécifiques face à ces composés polysaccharidiques. Cette réponse se caractérise par l'apparition d'IgM en très grandes quantités puis par d'autres classes d'immunoglobulines qui peuvent persister à plus long terme. Il faudrait certainement analyser ces réponses et voir si elles peuvent induire une certaine protection face à une réinfection ultérieure. Ces études pourraient ainsi ouvrir la voie à de nouveaux vaccins. Des vaccins basés sur des glycoconjugués pourraient être envisagés si la réponse anti-polysaccharide est protectrice, à l'instar de ce qui se réalise pour les vaccins anti-méningite. Par ailleurs, des vaccins vivants ou inactivés, basés sur des souches ayant perdu la capacité de produire des polysaccharides, pourraient être envisagés si la réponse induite par ces composés ne participe pas à la protection, voire la contrecarre.

ANNEXES



ANNEXE I

Selon Le Minor et Véron, la classification est la méthode qui permet de ségréger des objets en groupes apparentés sur la base de critères divers. Lorsque les objets à classer sont des organismes, leur classification s'appelle taxonomie (**Le Minor & Véron**, 1982). Le résultat de cette taxonomie est la systématique qui décrit les groupes d'organismes et les relations qu'ils ont entre eux. Il existe maintenant un consensus pour admettre que la taxonomie doit refléter la phylogénie c'est-à-dire une analyse des relations évolutives entre les différents groupes. Par ailleurs, la nomenclature est l'ensemble des règles qui président à l'attribution d'un nom à chaque taxon distinct. Au final chaque taxon est inclus dans un genre et reçoit un nom d'espèce ([classification binomiale de Linné](#)).

L'identification est l'attribution d'un nom à une souche ou un isolat sur la base d'un certain nombre de comparaisons plus ou moins codifiées. Le processus s'appelle détermination.

Il n'existe pas de règle précise qui définisse ce que représente un genre ou une espèce bactérienne. Au final la classification résulte d'un consensus entre spécialistes et il est clair, dans ces conditions, que la classification et la systématique soit en perpétuelle remaniement. A fortiori il n'existe pas non plus de règle pour définition de sous-ensembles d'individus au sein d'une espèce permettant, par exemple, de définir ce qu'est une sous-espèce bactérienne. Les espèces ou sous-espèces ont pu également être subdivisées en "biotypes" ou en "sérotypes" sur la base d'un phénotype commun à un sous-ensemble de souches.

Pour rester synthétique, une espèce est un groupe de souches qui ont un haut degré de similitude entre elles et qui diffèrent significativement des autres groupes sur un nombre important de caractéristiques indépendantes (**Gordon**, 1978). L'image la plus parlante étant celle de Vandamme qui a parlé d'une espèce bactérienne comme d'un nœud condensé dans un espace taxonomique nuageux confluent (**Vandamme, et al.**, 1996). Cette image des nuages qui peuvent être plus ou moins condensés et/ou confluent reflète bien la variabilité qui peut exister entre différentes espèces. Cependant la mise en évidence des transferts

latéraux de gènes au sein d'un certain nombre d'espèces bactérienne est venue troubler ces définitions.

L'identification d'une souche bactérienne et notamment d'un mycoplasme ne peut se faire qu'à partir d'une culture pure. Comme la morphologie des colonies de mycoplasmes n'étant pas particulièrement spécifique d'espèce, il est nécessaire de pratiquer des clonages pour aboutir à une culture pure. Cependant cette notion de "pureté" est toute relative car la mise en culture d'un individu unique va aboutir à une population (passage d'un individu unique à une population de l'ordre de 10^9 - 10^{10} individus) où les individus pourront éventuellement différer les uns des autres. L'ampleur des différences est fonction de l'espèce et des mécanismes qui sont en jeu pour l'induction de ces différences (fidélité des polymérases, mécanismes de réparation, induction de remaniements d'organisation du génome...). Pour les mycoplasmes il n'est pas rare de constater l'apparition de "variants" au sein d'une souche pourtant théoriquement pure. Ces variants sont en général notés lorsqu'ils diffèrent par une caractéristique aisément observable (par reconnaissance par un anticorps monoclonal, par un aspect particulier des colonies...). Cependant il faut garder à l'esprit qu'au sein d'une population les individus peuvent différer à priori les uns des autres ne serait-ce que d'un seul SNP.

ANNEXE II

Figures supplémentaires de l'article 1 (chapitre II)

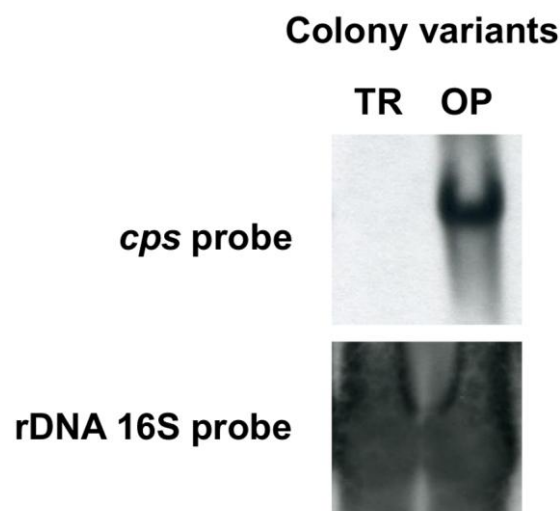


Figure S1 : Northern blot hybridization of total RNA of the opaque (OP) and translucent (TR) colony variants of *Mmm* strain Afadé with a *cps* (MSC_0109) or rDNA 16S probe.

Total RNA extraction and northern blot hybridization was performed as previously described (Gaurivaud, *et al.*, 2001). The rDNA 16S probe was obtained by PCR (Johansson, *et al.*, 1998). Transcription of the rDNA 16S was used to normalize the hybridization.

The *cps* gene probe was obtained by PCR with specific primers (5'TGATGGATCAACAGATAACACCA 3' and 5' TTTGGGCGTGAGTATCAATAAG 3').

doi: [10.1371/journal.pone.0068373.s001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068373.s001)

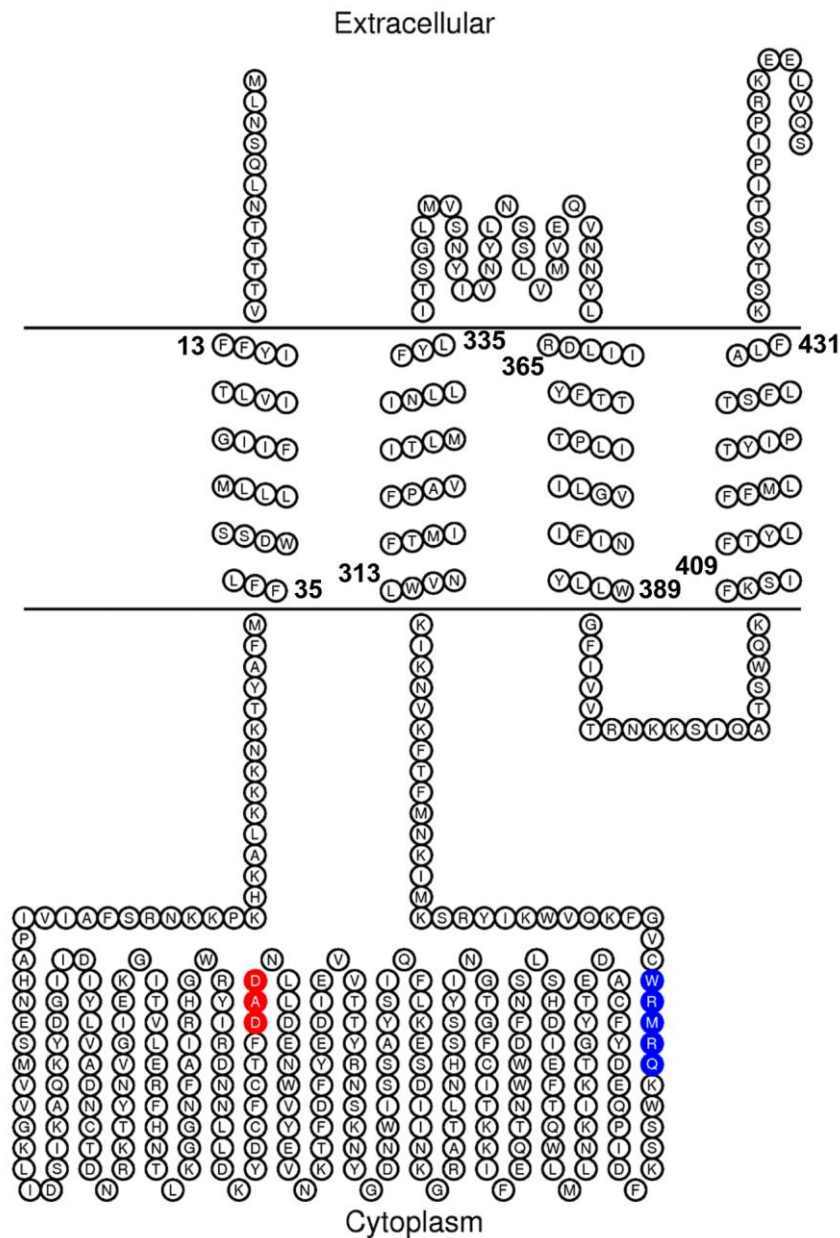


Figure S2 : Schematic representation of the predicted membrane topology of *Mmm* EpsG (MSC_0108) glycosyltransferase.

Numbers indicate the localization of transmembrane helices. DxD (red) and RxxQW (blue) motifs are showed.

doi: [10.1371/journal.pone.0068373.s002](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068373.s002)

ANNEXE III



Figure S3 : Séquestre pulmonaire.

Dans les cas chroniques de PPCB, les lésions pulmonaires évoluent vers la formation de « séquestres » (flèche noire). (crédits photographiques : François Thiaucourt)

ANNEXE IV

Génération d'une banque de mutants par mutagenèse aléatoire insertionnelle chez *Mmm*

Cette banque a été réalisée par Maud Petit lors de son post-doctorat au sein du CIRAD, sous l'encadrement de Lucia Maso-Silvan et de François Thiaucourt.

Les mutants ont été obtenus par l'insertion aléatoire, dans le génome de la souche sauvage africaine hautement pathogène 8740, du transposon Tn4001 porté par le plasposon pMT85/2res (Fig. S4) (Janis, *et al.*, 2008).

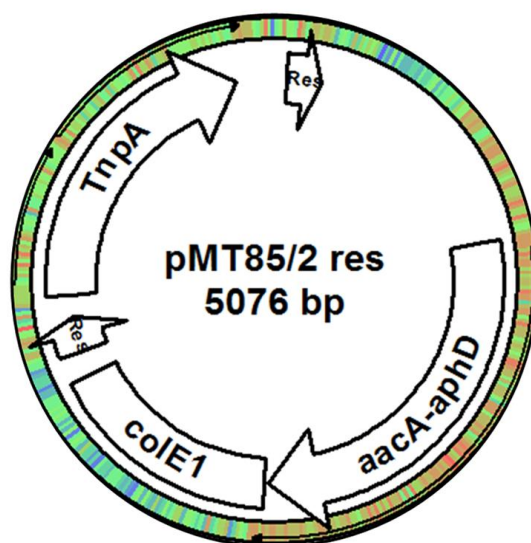


Figure S4 : Représentation du plasposon pMT85/2res avec le logiciel pDraw32

Le pMT85/2res code une transposase (TnpA) permettant l'intégration du Tn4001 dans le génome par la reconnaissance de séquences inverses répétées qui encadrent ce dernier. Le gène codant la transposase est en dehors du transposon, garantissant une insertion stable de celui-ci dans le génome ciblé. De plus, l'origine colE1 permet de multiplier le plasposon uniquement chez *E. coli*. La sélection des transformants est assurée par une résistance aux aminosides de type gentamycine ou kanamycine conférée aux mutants par le gène *aacA-aphD* situé dans le transposon. Enfin, l'encadrement du transposon par des séquences *res* offre la possibilité d'éliminer la résistance par l'action d'une résolvase et ainsi d'obtenir un organisme génétiquement modifié utilisable pour des essais vaccinaux par exemple.

Après transformation puis isolement sur milieu sélectif, la présence du gène codant la résistance antibiotique a été contrôlée par PCR pour chacun des mutants. La localisation du transposon par séquençage a également été réalisée. La banque était alors constituée de 2000 clones soit une couverture théorique de 4X. Elle comporte à ce jour un peu plus de 800 mutants caractérisés dont 284 sont inactivés dans une séquence codante, les autres ayant le transposon localisé dans des zones intergéniques ou des IS.

ANNEXE V

Figures supplémentaires de l'article 2 (chapitre III)

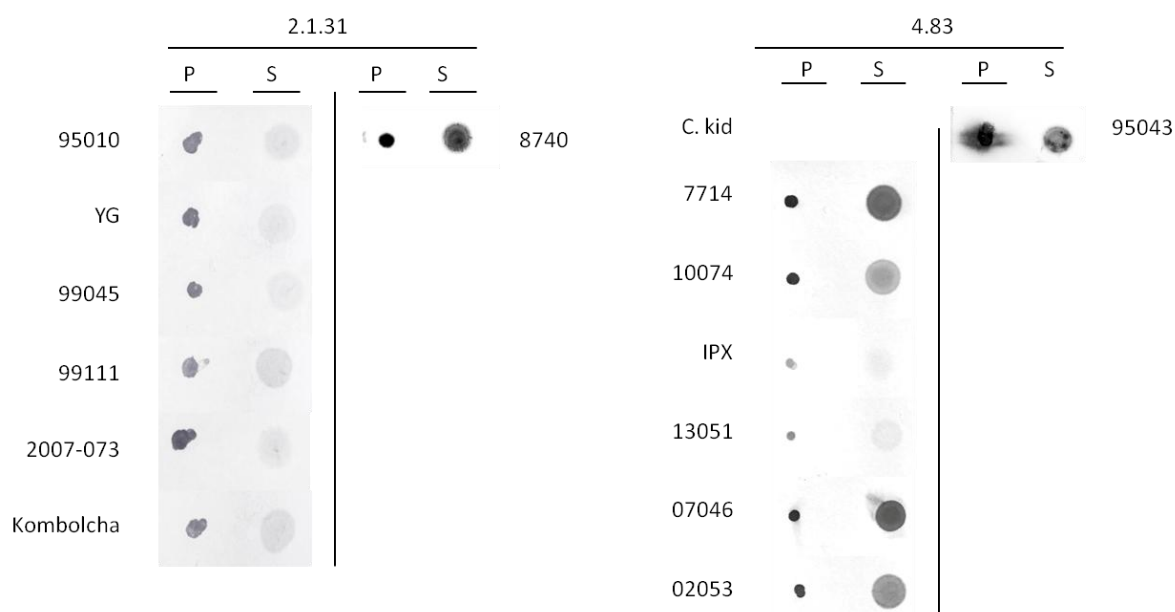


Figure S5: Dot blot analysis of polysaccharides produced by some *Mmc* serovar "LC" and *Mcc* strains with Mab 2.1.31 and Mab 4.83, respectively.

The two Mabs were used against mycoplasmas cells grown in PPLO medium and washed once in PBS (C) and corresponding culture (S). Mabs 2.1.31 *i.e.* anti-galactan were used on *Mmc* serovar "LC" strains and Mabs 4.83 *i.e.* anti-glucan on *Mcc* strains. *Mmm* 8740 and *Mccp* 95043 were used as positive controls.

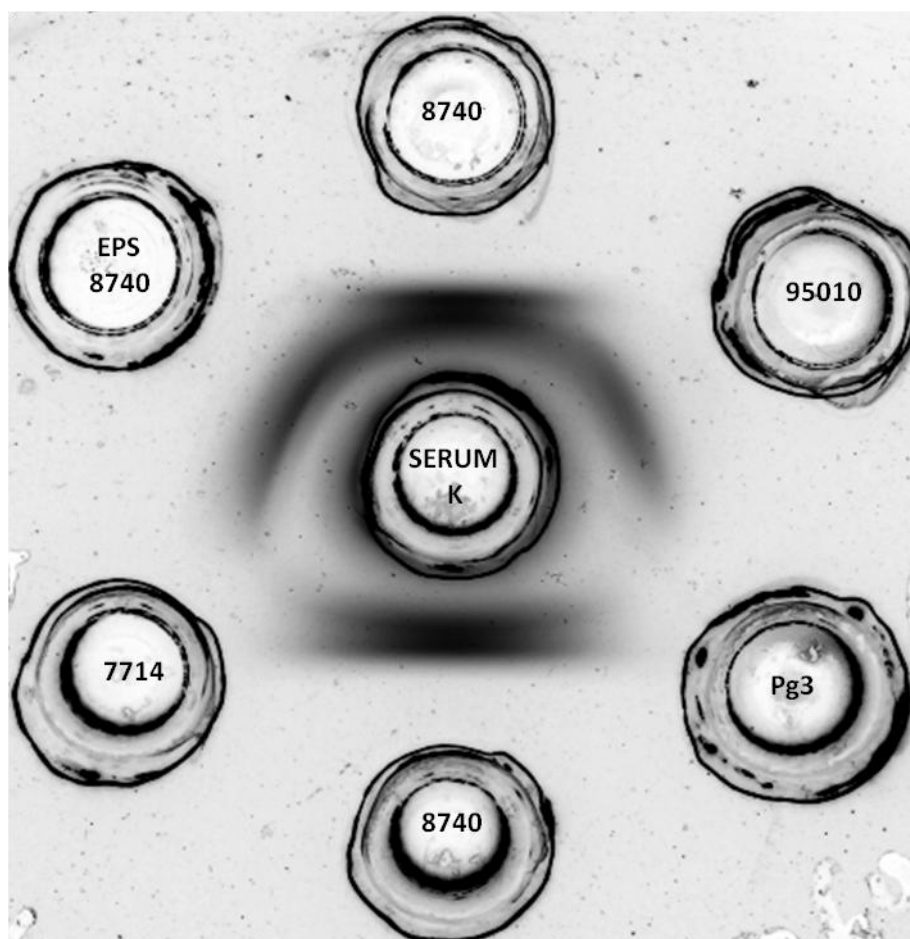


Figure S6: Agar gel immunoprecipitation of exopolysaccharides with a convalescent CBPP bovine serum.

The co-migration of an immune convalescent CBPP bovine serum in the center well and an *Mmm* culture (8740) is producing two main precipitation lines. By contrast, only one line is obtained with *Mmm* extracted EPS (EPS 8740) and with the *Mmc*"LC" culture (95010). No precipitation line is observed with a *Mmc* serovar "capri" (PG3) or *Mcc* (7714) culture. The picture is shown as a "negative" to make precipitation lines appear black on a clear background.

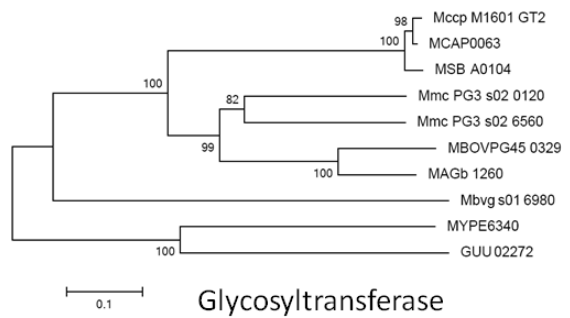
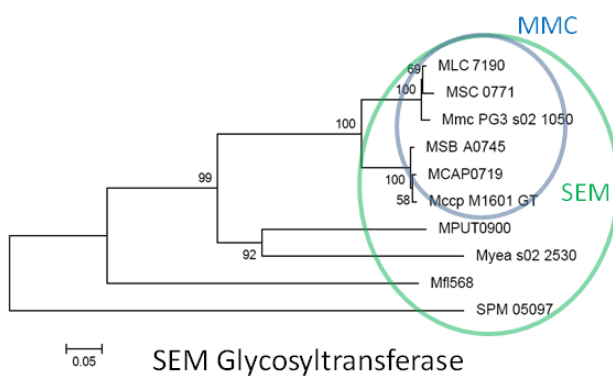
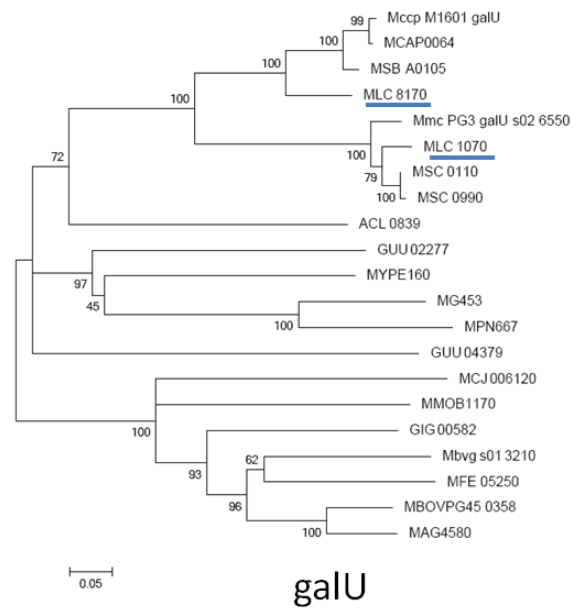
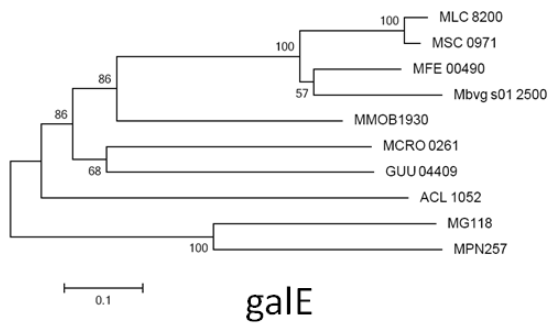
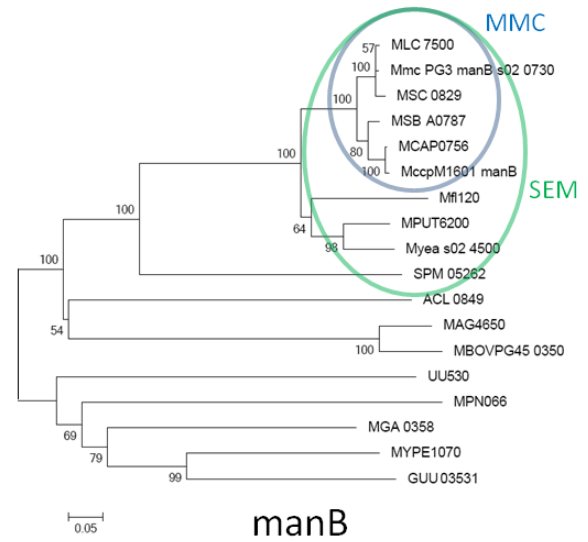
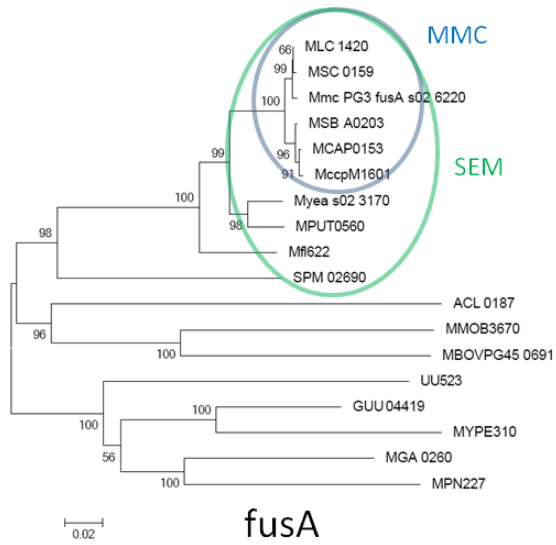


Figure S7: Protein phylogenetic trees with genes of the *Mycoplasma mycoides* cluster involved in their polysaccharides synthesis pathway.

For each selected gene product, the homologous mycoplasma genes were identified by BLASTP analyses in the Molligen database with an E-Value threshold at 10^{-8} . Proteic sequences were retrieved, aligned and the evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates was taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates were collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) was shown next to the branches. Each tree was drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and were in the units of the number of amino acid substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5.

BLASTP analysis performed with: FusA MLC_1420, ManB MLC7500, GalE MLC_8200
GalU MLC_8170, Glycosyltransferase MCAP_0063, SEM-Glycosyltransferase MLC_7190

(ACL : *Acholeplasma laidawii*, GIG: *M. anatis*, GUU: *M. iowae*, MAG: *M. agalactiae*, Mbvg: *M. bovigenitalium*, MBOV: *M. bovis*, MCJ: *M. conjunctivae*, MCRO: *M. crocodyli*, MCAP and Mccp: *Mccp*, MFE: *M. fermentans*, Mfl: *Mesoplasma florum*, MG: *M. genitalium*, MGA: *M. Gallisepticum*, MLC: *Mmc* serovar "LC", MMOB: *M. mobile*, MPN: *M. pneumoniae*, MPUT: *M. putrefaciens*, MSB: *M. leachii*, MSC: *Mmm*, Myca: *Mmc* serovar "capri", MYPE: *M. penetrans*, SPM: *Spiroplasma melliferum*, UU: *Ureaplasma urealyticum*)

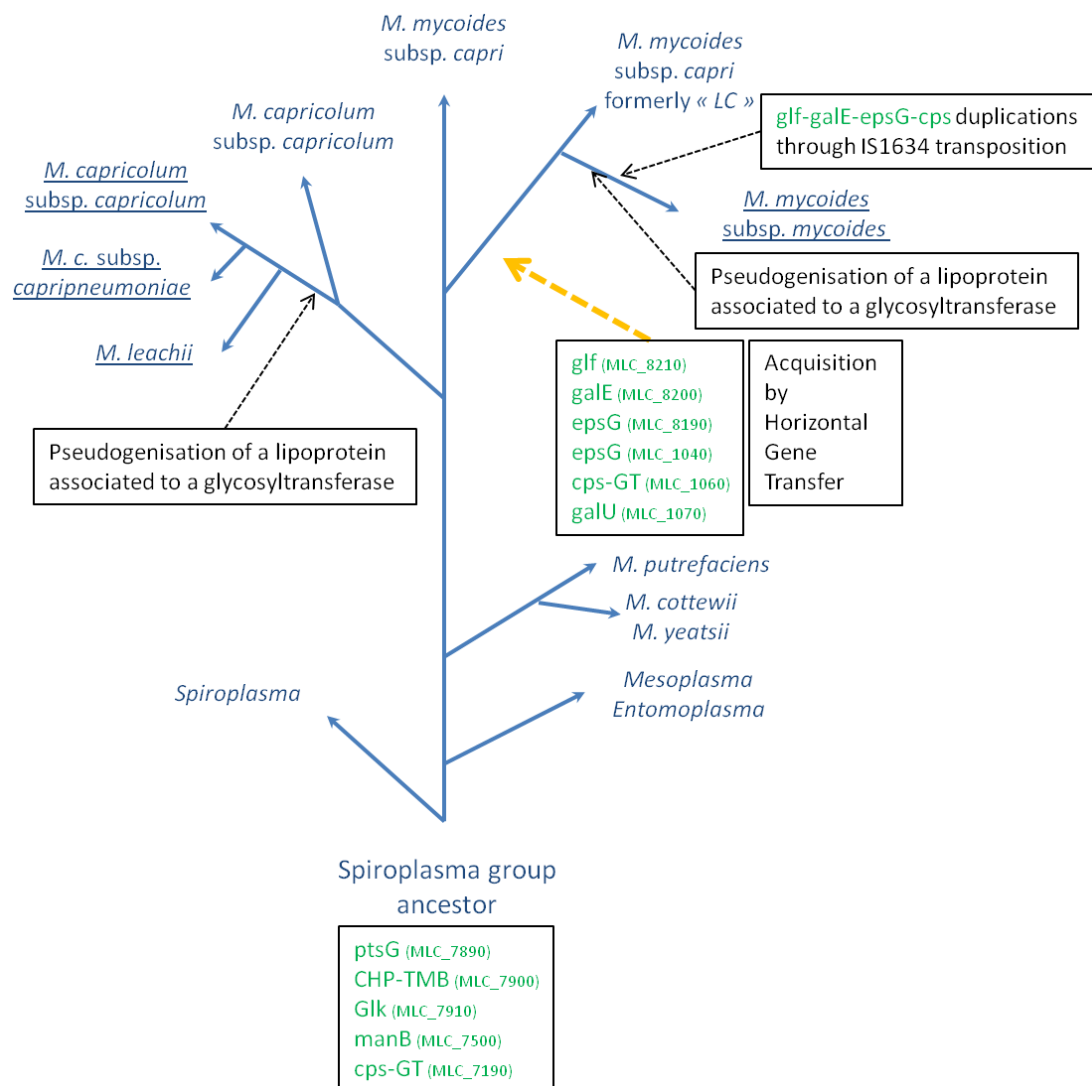


Figure S8: Schematic representation of the phylogeny of the "Spiroplasma group" organisms in relation to their polysaccharide synthesis.

Five genes are the direct descendants of the *Spiroplasma* ancestor: ptsG, CHP-TMB, glk, manB, cps-GT. Others, such as glf, galE, epsG, galU and glycosyltransferase, were acquired through horizontal gene transfer notably by the *Mmc* serovar "LC"-*Mmm* ancestor. Such an event allows the phenotypic distinction of *Mmc* serovar "LC" and *Mmc* serovar "capri" although these two subspecies are phylogenetically very close.

Species whose members are secreting EPS are underlined. This secretion is correlated with the pseudogenization of a lipoprotein gene located upstream a glycosyltransferase.

NB: The lengths of branches are not matching the phylogenetic distance.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdo EM**, Nicolet J & Frey J (2000) Antigenic and genetic characterization of lipoprotein LppQ from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Clin Diagn Lab Immunol* **7**: 588-595.
- Al-Aubaidi JM**, Dardiri AH & Fabricant J (1972) Biochemical Characterization and Antigenic Relationship of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, Freundt and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Edward) Freundt. *International journal of systematic bacteriology* **22**: 155-164.
- Almeida RA**, Wannemuehler MJ & Rosenbusch RF (1992) Interaction of *Mycoplasma dispar* with bovine alveolar macrophages. *Infect Immun* **60**: 2914-2919.
- Altschul SF**, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Andrés E**, Martinez N & Planas A (2011) Expression and characterization of a *Mycoplasma genitalium* glycosyltransferase in membrane glycolipid biosynthesis: potential target against mycoplasma infections. *J Biol Chem* **286**: 35367-35379.
- Andrés E**, Biarnés X, Faijes M & Planas A (2012) Bacterial glyco-glycerolipid synthases: processive and non-processive glycosyltransferases in mycoplasma. *Biocatalysis and Biotransformation* **30**: 274-287.
- Arellano-Reynoso B**, Lapaque N, Salcedo S, *et al.* (2005) Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* **6**: 618-625.
- Arif A**, Schulz J, Thiaucourt F, Taha A & Hammer S (2007) Contagious caprine pleuropneumonia outbreak in captive wild ungulates at Al Wabra Wildlife Preservation, State of Qatar. *J Zoo Wildl Med* **38**: 93-96.
- Barré A**, De Daruvar A & Blanchard A (2004) MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes. *Nucleic Acids Research* **32**: D307-D310.
- Bazaka K**, Crawford RJ, Nazarenko EL & Ivanova EP (2011) Bacterial extracellular polysaccharides. *Adv Exp Med Biol* **715**: 213-226.
- Belloy L**, Vilei EM, Giacometti M & Frey J (2003) Characterization of LppS, an adhesin of *Mycoplasma conjunctivae*. *Microbiology* **149**: 185-193.
- Bertin C**, Pau-Roblot C, Courtois J, *et al.* (2013) Characterization of Free Exopolysaccharides Secreted by *Mycoplasma mycoides* Subsp. *mycoides*. *PLoS One* **8**: e68373.
- Bertozi CRR, D.** (2009) *Structural Basis of Glycan Diversity. Chapter 2*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Bidossi A**, Mulas L, Decorosi F, *et al.* (2012) A Functional Genomics Approach to Establish the Complement of Carbohydrate Transporters in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE* **7**: e33320.
- Bischof DF**, Janis C, Vilei EM, Bertoni G & Frey J (2008) Cytotoxicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type to bovine epithelial cells. *Infect Immun* **76**: 263-269.
- Blanchard A** (1990) *Ureaplasma urealyticum* urease genes; use of a UGA tryptophan codon. *Mol Microbiol* **4**: 669-676.

- Bolland JR & Dybvig K** (2012) *Mycoplasma pulmonis* Vsa proteins and polysaccharide modulate adherence to pulmonary epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* **331**: 25-30.
- Bolland JR**, Simmons WL, Daubenspeck JM & Dybvig K (2012) Mycoplasma polysaccharide protects against complement. *Microbiology* **158**: 1867-1873.
- Borrel AD-b, E.**; Jeantet, C.; Jouan, C. (1910) Le microbe de la péripneumonie *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **24**: 168-179.
- Brady RA**, O'May GA, Leid JG, Prior ML, Costerton JW & Shirtliff ME (2011) Resolution of *Staphylococcus aureus* biofilm infection using vaccination and antibiotic treatment. *Infect Immun* **79**: 1797-1803.
- Branda SS**, Vik Å, Friedman L & Kolter R (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* **13**: 20-26.
- Brenner C**, Wroblewski H, Le Henaff M, Montagnier L & Blanchard A (1997) Spiralin, a mycoplasmal membrane lipoprotein, induces T-cell-independent B-cell blastogenesis and secretion of proinflammatory cytokines. *Infect Immun* **65**: 4322-4329.
- Brooks BW**, Lutze-Wallace CL, Lu P & Robertson RH (2004) Identification and serological specificity of a polysaccharide component from *Mycoplasma bovis*. *Vet Res Commun* **28**: 197-208.
- Brown AJ** (1886) XLIII.-On an acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society, Transactions* **49**: 432-439.
- Brown DR**, Whitcomb RF & Bradbury JM (2007) Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 2703-2719.
- Bruderer U**, Regalla J, Abdo el M, Huebschle OJ & Frey J (2002) Serodiagnosis and monitoring of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) with an indirect ELISA based on the specific lipoprotein LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet Microbiol* **84**: 195-205.
- Buttery SH & Plackett P** (1960) A specific polysaccharide from *Mycoplasma mycoides*. *J Gen Microbiol* **23**: 357-368.
- Cantarel BL**, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V & Henrissat B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* **37**: D233-238.
- Chambaud I**, Wroblewski H & Blanchard A (1999) Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends in Microbiology* **7**: 493-499.
- Chang JT**, Liu HJ & Yu L (2011) *Mycoplasma leachii* sp. nov. in calves, China. *Emerging infectious diseases* **17**: 1772-1773.
- Chazel M**, Tardy F, Le Grand D, Calavas D & Poumarat F (2010) Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Vet Res* **6**: 32.
- Choma A & Komaniecka I** (2003) Characterisation of *Mesorhizobium huakuii* cyclic beta-glucan. *Acta Biochim Pol* **50**: 1273-1281.

- Ciccarelli FD**, Doerks T, von Mering C, Creevey CJ, Snel B & Bork P (2006) Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* **311**: 1283-1287.
- Citti C & Rosengarten R** (1997) Mycoplasma genetic variation and its implication for pathogenesis. *Wien Klin Wochenschr* **109**: 562-568.
- Citti C**, Kim MF & Wise KS (1997) Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. *Infect Immun* **65**: 1773-1785.
- Citti C**, Nouvel LX & Baranowski E (2010) Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol* **5**: 1073-1085.
- Cordy D**, Adler H & Yamamoto R (1955) A pathogenic pleuropneumonia-like organism from goats. *The Cornell veterinarian* **45**: 50.
- Cottew GS & Yeats FR** (1978) Subdivision of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from cattle and goats into two types. *Aust Vet J* **54**: 293-296.
- Cottew GS**, Breard A, DaMassa AJ, et al. (1987) Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Isr J Med Sci* **23**: 632-635.
- Cuthbertson L**, Kos V & Whitfield C (2010) ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 341-362.
- Dabour N & LaPointe G** (2005) Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7414-7425.
- Dedieu-Engelmann L** (2008) Contagious bovine pleuropneumonia: a rationale for the development of a mucosal sub-unit vaccine. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **31**: 227-238.
- Dedieu L**, Mady V & Lefevre PC (1994) Development of a selective polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* S.C. (contagious bovine pleuropneumonia agent). *Vet Microbiol* **42**: 327-339.
- Dedieu L**, Totte P, Rodrigues V, Vilei EM & Frey J (2010) Comparative analysis of four lipoproteins from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony identifies LppA as a major T-cell antigen. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **33**: 279-290.
- Deng L**, Kasper DL, Krick TP & Wessels MR (2000) Characterization of the linkage between the type III capsular polysaccharide and the bacterial cell wall of group B *Streptococcus*. *J Biol Chem* **275**: 7497-7504.
- Denison AM**, Clapper B & Dybvig K (2005) Avoidance of the host immune system through phase variation in *Mycoplasma pulmonis*. *Infect Immun* **73**: 2033-2039.
- Deutscher J**, Francke C & Postma PW (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 939-1031.
- DuBois M**, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA & Smith F (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* **28**: 350-356.

Dupuy V, Manso-Silvan L, Barbe V, *et al.* (2012) Evolutionary History of Contagious Bovine Pleuropneumonia Using Next Generation Sequencing of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* "Small Colony". *PLoS ONE* **7**: e46821.

Edward DGf (1955) A suggested classification and nomenclature for organisms of the pleuropneumonia group. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* **5**: 85-93.

Edward DGf & Freundt EA (1967) Proposal for Mollicutes as name of the class established for the order Mycoplasmatales. *International journal of systematic bacteriology* **17**: 267-268.

Esko JDD, T.L.; Raetz, C.R.H. (2009) Chapter 20. Eubacteria and Archaea. 2nd edition. *Essentials of Glycobiology.*, (Varki A CR, Esko JD, ed.^eds.), p.^pp. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783–791.

Ferreira DM, Jambo KC & Gordon SB (2011) Experimental human pneumococcal carriage models for vaccine research. *Trends Microbiol* **19**: 464-470.

Firrao G & Brown DR (2011) International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Mollicutes. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 695-697.

Firrao G & Brown DR (2013) International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of Mollicutes: Minutes of the meetings, July 15th and 19th 2012, Toulouse, France. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 2361-2364.

Fischer A, Santana-Cruz I, Giglio M, *et al.* (2013) Genome Sequence of *Mycoplasma feriruminatoris* sp. nov., a Fast-Growing Mycoplasma Species. *Genome Announc* **1**.

Fischer A, Shapiro B, Muriuki C, *et al.* (2012) The origin of the 'Mycoplasma mycoides cluster' coincides with domestication of ruminants. *PLoS One* **7**: e36150.

Flemming H-C & Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 623-633.

Forde A & Fitzgerald GF (2003) Molecular organization of exopolysaccharide (EPS) encoding genes on the lactococcal bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658. *Plasmid* **49**: 130-142.

Fraser CM, Gocayne JD, White O, *et al.* (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**: 397-403.

Garrity GM, Bell JA & Lilburn TG (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. *Springer, New York, Berlin, Heidelberg*.

Gasparich GE, Whitcomb RF, Dodge D, French FE, Glass J & Williamson DL (2004) The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 893-918.

Gaurivaud P, Laigret F, Garnier M & Bove JM (2001) Characterization of FruR as a putative activator of the fructose operon of *Spiroplasma citri*. *FEMS Microbiol Lett* **198**: 73-78.

- Gaurivaud P**, Persson A, Grand DL, Westberg J, Solsona M, Johansson KE & Poumarat F (2004) Variability of a glucose phosphotransferase system permease in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony. *Microbiology* **150**: 4009-4022.
- Geiger O**, Weissborn AC & Kennedy EP (1991) Biosynthesis and excretion of cyclic glucans by *Rhizobium meliloti* 1021. *J Bacteriol* **173**: 3021-3024.
- Gibson DG**, Glass JI, Lartigue C, *et al.* (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* **329**: 52-56.
- Glass JI**, Assad-Garcia N, Alperovich N, *et al.* (2006) Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 425-430.
- Gomez-Martin A**, Amores J, Paterna A & De la Fe C (2013) Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control. *Vet J.*
- Gordon RE** (1978) A Species Definition. *International journal of systematic bacteriology* **28**: 605-607.
- Gotschlich EC**, Fraser BA, Nishimura O, Robbins JB & Liu TY (1981) Lipid on capsular polysaccharides of gram-negative bacteria. *J Biol Chem* **256**: 8915-8921.
- Gourlay RN** (1962) Polysaccharide haptens from urine of cattle infected with *Mycoplasma mycoides*. *Nature* **195**: 99.
- Gourlay RN & Shifrine M** (1966) Antigenic cross-reactions between the galactan from *Mycoplasma mycoides* and polysaccharides from other sources. *J Comp Pathol* **76**: 417-425.
- Gourlay RN & Thrower KJ** (1968) Morphology of *Mycoplasma mycoides* thread-phase growth. *J Gen Microbiol* **54**: 155-159.
- Guell M**, van Noort V, Yus E, *et al.* (2009) Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science* **326**: 1268-1271.
- Guidolin LS**, Ciocchini AE, Inon de Iannino N & Ugalde RA (2009) Functional mapping of *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan synthase: identification of the protein domain required for cyclization. *J Bacteriol* **191**: 1230-1238.
- Hadush B**, Eshetu L, Mengistu W & Hailesilassie M (2009) Seroprevalence of contagious caprine pleuropneumonia in Kefta Humera, Alamata (Tigray) and Aba-’ala (Afar), Northern Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* **41**: 803-806.
- Hamsten C**, Westberg J, Bolske G, Ayling R, Uhlen M & Persson A (2008) Expression and immunogenicity of six putative variable surface proteins in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiology* **154**: 539-549.
- Harlow E & Lane D** (1988) Antibodies : A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory* 310-311.
- Herbelin A**, Ruuth E, Delorme D, Michel-Herbelin C & Praz F (1994) *Mycoplasma arginini* TUH-14 membrane lipoproteins induce production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha by human monocytes. *Infect Immun* **62**: 4690-4694.

- Howard C** & Glynn A (1971) The virulence for mice of strains of *Escherichia coli* related to the effects of K antigens on their resistance to phagocytosis and killing by complement. *Immunology* **20**: 767.
- Howard CJ** & **Gourley RN** (1974) An electron-microscopic examination of certain bovine mycoplasmas stained with ruthenium red and the demonstration of a capsule on *Mycoplasma dispar*. *J Gen Microbiol* **83**: 393-398.
- Hudson R**, **Buttery SH** & **Cottew GS** (1967) Investigations into the influence of the galactan of *Mycoplasma mycoides* on experimental infection with that organism. *J. Pathol. Bacteriol.* **94**: 257-273.
- Hum S**, **Kessell A**, **Djordjevic S**, **Rheinberger R**, **Hornitzky M**, **Forbes W** & **Gonsalves J** (2000) Mastitis, polyarthritis and abortion caused by *Mycoplasma* species bovine group 7 in dairy cattle. *Australian Veterinary Journal* **78**: 744-750.
- Hutchison CA**, **Peterson SN**, **Gill SR**, *et al.* (1999) Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome. *Science* **286**: 2165-2169.
- Janis C**, **Bischof D**, **Gourgues G**, **Frey J**, **Blanchard A** & **Sirand-Pugnet P** (2008) Unmarked insertional mutagenesis in the bovine pathogen *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: characterization of a lppQ mutant. *Microbiology* **154**: 2427-2436.
- Jann K** & **Jann B** (1987) Polysaccharide antigens of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis* **9 Suppl 5**: S517-526.
- Johansson KE**, **Heldtander MU** & **Pettersson B** (1998) Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. *Methods Mol Biol* **104**: 145-165.
- Jones AS**, **Tittensor JR** & **Walker RT** (1965) The chemical composition of the nucleic acids and other macromolecular constituents of *Mycoplasma mycoides* var. *capri*. *J Gen Microbiol* **40**: 405-411.
- Jores J**, **Fischer A**, **Sirand-Pugnet P**, *et al.* (2013) *Mycoplasma feriruminatoris* sp. nov., a fast growing *Mycoplasma* species isolated from wild Caprinae. *Syst Appl Microbiol*.
- Kannan TR** & **Baseman JB** (2000) Hemolytic and hemoxidative activities in *Mycoplasma penetrans*. *Infect Immun* **68**: 6419-6422.
- Kawaharada Y**, **Kiyota H**, **Eda S**, **Minamisawa K** & **Mitsui H** (2008) Structural characterization of neutral and anionic glucans from *Mesorhizobium loti*. *Carbohydr Res* **343**: 2422-2427.
- Kingeter LM** & **Lin X** (2012) C-type lectin receptor-induced NF-kappaB activation in innate immune and inflammatory responses. *Cell Mol Immunol* **9**: 105-112.
- Klement MLR**, **Öjemyr L**, **Tagscherer KE**, **Widmalm G** & **Wieslander Å** (2007) A processive lipid glycosyltransferase in the small human pathogen *Mycoplasma pneumoniae*: involvement in host immune response. *Molecular Microbiology* **65**: 1444-1457.
- Kobayashi H**, **Runge M**, **Schmidt R**, **Kubo M**, **Yamamoto K** & **Kirchhoff H** (1997) *Mycoplasma lagogenitalium* sp. nov., from the preputial smegma of Afghan pikas (*Ochotona rufescens rufescens*). *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1208-1211.

Konings WN, Poolman B & Van Veen HW (1994) Solute transport and energy transduction in bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**: 369-380.

Krieg N, Ludwig W, Whitman W, Hedlund B, Paster B & Staley J (2010) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. ed.^eds.), p.^pp. Springer, New York, NY, USA.

Kurotchkin TJ (1937) Specific carbohydrate from *Asterococcus mycoides* for serological tests of bovine pleuropneumonia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **37**: 21-22.

Lartigue C, Glass JI, Alperovich N, *et al.* (2007) Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* **317**: 632-638.

Lartigue C, Vashee S, Algire MA, *et al.* (2009) Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science* **325**: 1693-1696.

Laws L (1956) A pleuropneumonia-like organism causing peritonitis in goats. *Australian Veterinary Journal* **32**: 326-329.

Le Goff C (1986) Immunoenzyme technic applied to the serological diagnosis of pleuropneumonia. Preliminary note. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* **39**: 171-173.

Le Grand D, Saras E, Blond D, Solsona M & Poumarat F (2004) Assessment of PCR for routine identification of species of the *Mycoplasma mycoides* cluster in ruminants. *Vet Res* **35**: 635-649.

Le Minor L & Véron M (1982) *Bactériologie médicale*. Flammarion médecine-sciences.

Lemcke RM (1965) A serological comparison of various species of mycoplasma by an agar gel double-diffusion technique. *J. Gen. Microbiol.* **38**: 91-100.

Llobet E, Tomas JM & Bengoechea JA (2008) Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* **154**: 3877-3886.

Lloyd LC, Buttery SH & Hudson JR (1971) The effect of the galactan and other antigens of *Mycoplasma mycoides* var. *Mycoides* on experimental infection with that organism in cattle. *J Med Microbiol* **4**: 425-439.

Lorenzon S, Manso-Silvan L & Thiaucourt F (2008) Specific real-time PCR assays for the detection and quantification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *Mol Cell Probes* **22**: 324-328.

Lorenzon S, David A, Nadew M, Wesonga H & Thiaucourt F (2000) Specific PCR identification of the T1 vaccine strains for contagious bovine pleuropneumonia. *Mol Cell Probes* **14**: 205-210.

MacOwan KJ & Minette J (1976) A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Trop Anim Health Prod* **8**: 91-95.

Maniloff J (2002) Phylogeny and Evolution. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*, (Razin S & Herrmann R, ed.^eds.), p.^pp. 31-43. Springer US.

Manso-Silvan L, Perrier X & Thiaucourt F (2007) Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 2247-2258.

Manso-Silvan L, Dupuy V, Chu Y & Thiaucourt F (2011) Multi-locus sequence analysis of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* for the molecular epidemiology of contagious caprine pleuropneumonia. *Vet Res* **42**: 86.

Manso-Silvan L, Vilei EM, Sachse K, Djordjevic SP, Thiaucourt F & Frey J (2009) *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 1353-1358.

Manso-Silvan L, Tardy F, Baranowski E, *et al.* (2013) Draft Genome Sequences of *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma arginini*, and *Mycoplasma bovigenitalium*, Three Species with Equivocal Pathogenic Status for Cattle. *Genome Announc* **1**.

March JB, Gammack C & Nicholas R (2000) Rapid detection of contagious caprine pleuropneumonia using a *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* capsular polysaccharide-specific antigen detection latex agglutination test. *J Clin Microbiol* **38**: 4152-4159.

March JB, Kerr K & Lema B (2003) Rapid detection of contagious bovine pleuropneumonia by a *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC capsular polysaccharide-specific antigen detection latex agglutination test. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**: 233-240.

Mayberry WR, Langworthy TA & Smith PF (1976) Structure of the mannoheptose-containing pentaglycosyldiacylglycerol from *Acholeplasma modicum*. *Biochim Biophys Acta* **441**: 115-122.

Miles RJ, Wadher BJ, Henderson CL & Mohan K (1988) Increased Growth Yields of *Mycoplasma* Spp in the Presence of Pyruvate. *Lett Appl Microbiol* **7**: 149-151.

Montague MG, Lartigue C & Vashee S (2012) Synthetic genomics: potential and limitations. *Curr Opin Biotechnol* **23**: 659-665.

Moxon ER & Kroll JS (1990) The Role of Bacterial Polysaccharide Capsules as Virulence Factors. *Bacterial Capsules*, Vol. 150 (Jann K & Jann B, ed.[^]eds.), p.[^]pp. 65-85. Springer Berlin Heidelberg.

Mulongo MM, Frey J, Smith K, Schnier C, Wesonga H, Naessens J & McKeever D (2013) Cattle immunized against the pathogenic L-alpha-glycerol-3-phosphate oxidase of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* fail to generate neutralizing antibodies and succumb to disease on challenge. *Vaccine* **31**: 5020-5025.

Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y & Tully JG (2001) Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 891-899.

Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y & Tully JG (2002) Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 683.

- Neyrolles O**, Brenner C, Prevost MC, Fontaine T, Montagnier L & Blanchard A (1998) Identification of two glycosylated components of *Mycoplasma penetrans*: a surface-exposed capsular polysaccharide and a glycolipid fraction. *Microbiology* **144** (Pt 5): 1247-1255.
- Nocard ER**, E.R.; Borrel, A.; Salimbeni, T.; Dujardin-Beaumetz, E. (1898) Le microbe de la peripneumonie. *Annales de l'Institut Pasteur*. **12** 240-262.
- Ophir T & Gutnick DL** (1994) A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl Environ Microbiol* **60**: 740-745.
- Ozdemir U**, Ozdemir E, March JB, Churchward C & Nicholas RAJ (2005) Contagious caprine pleuropneumonia in the Thrace region of Turkey. *Veterinary Record* **156**: 286-287.
- Pasteur L** (1861) On the viscous fermentation and the butyrous fermentation. *Bull. Soc. Chim. Paris* **11**: 30-31.
- Persson A**, Jacobsson K, Frykberg L, Johansson KE & Poumarat F (2002) Variable surface protein Vmm of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *J Bacteriol* **184**: 3712-3722.
- Pettersson B**, Leitner T, Ronaghi M, Bolske G, Uhlen M & Johansson KE (1996) Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *J Bacteriol* **178**: 4131-4142.
- Pilo P**, Frey J & Vilei EM (2007) Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet J* **174**: 513-521.
- Pilo P**, Martig S, Frey J & Vilei EM (2003) Antigenic and genetic characterisation of lipoprotein lppC from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet Res* **34**: 761-775.
- Pilo P**, Vilei EM, Peterhans E, Bonvin-Klotz L, Stoffel MH, Dobbelaere D & Frey J (2005) A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J Bacteriol* **187**: 6824-6831.
- Pitarque S**, Larrouy-Maumus G, Payre B, Jackson M, Puzo G & Nigou J (2008) The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface. *Tuberculosis (Edinb)* **88**: 560-565.
- Plackett P & Buttery SH** (1964) A galactofuranose disaccharide from the galactan of *Mycoplasma mycoides*. *Biochem J* **90**: 201-205.
- Plackett PB**, S.H.; Cottew, G.S. (1963) Carbohydrates of some mycoplasma strains. *Recent Progress in Microbiology Symposia of the 8th congress of Microbiology, Montreal, Canada* 535-547.
- Pollack JD**, Williams MV & McElhaney RN (1997) The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. *Crit Rev Microbiol* **23**: 269-354.
- Postma PW**, Lengeler JW & Jacobson GR (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 543-594.

Poumarat F, Longchambon D & Martel JL (1992) Application of dot immunobinding on membrane filtration (MF dot) to the study of relationships within "M. mycoides cluster" and within "glucose and arginine-negative cluster" of ruminant mycoplasmas. *Vet Microbiol* **32**: 375-390.

Provost AP, P.; Breard, A.; Le Goff, C.; Martel, J. L.; and Cottew; G. S. (1987) Contagious bovine pleuropneumonia. *Revue scientifique et technique Office International des Epizooties* **6**: 625-679.

Provost AP, P.; Quéval, R. (1964) Recherches immunologiques sur la péripneumonie. VIII - Présence possible d'un antigène à activité sérologique Forssman chez *Mycoplasma mycoides*. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* **17**: 15-22.

Razin S & Oliver O (1961) Morphogenesis of Mycoplasma and Bacterial L-form Colonies. *J Gen Microbiol* **24**: 225-237.

Razin S, Yogev D & Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1094-1156.

Reckseidler-Zenteno SL (2012) *Capsular Polysaccharides Produced by the Bacterial Pathogen Burkholderia pseudomallei*.

Regalla J, Caporale V, Giovannini A, Santini F, Martel JL & Goncalves AP (1996) Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Europe. *Rev Sci Tech* **15**: 1309-1329.

Rehm BH (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat Rev Microbiol* **8**: 578-592.

Reid CW, Fulton KM & Twine SM (2010) Never take candy from a stranger: the role of the bacterial glycome in host-pathogen interactions. *Future Microbiol* **5**: 267-288.

Rurangirwa FR, McGuire TC, Kibor A & Chema S (1987b) A latex agglutination test for field diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia. *Vet Rec* **121**: 191-193.

Rurangirwa FR, Wambugu A, Kihara SM & McGuire TC (1995) A Mycoplasma strain F38 growth-inhibiting monoclonal antibody (WM-25) identifies an epitope on a surface-exposed polysaccharide antigen. *Infect Immun* **63**: 1415-1420.

Rurangirwa FR, McGuire TC, Magnuson NS, Kibor A & Chema S (1987a) Composition of a polysaccharide from mycoplasma (F-38) recognised by antibodies from goats with contagious pleuropneumonia. *Res Vet Sci* **42**: 175-178.

Sachse K, Helbig JH, Lysnyansky I, Grajetzki C, Muller W, Jacobs E & Yogev D (2000) Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. *Infect Immun* **68**: 680-687.

Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.

Schiefer HG, Krauss H, Brunner H & Gerhardt U (1975) Ultrastructural visualization of surface carbohydrate structures on mycoplasma membranes by concanavalin A. *J Bacteriol* **124**: 1598-1600.

Shahram M, Nicholas RA, Miles RJ, Wood AP & Kelly DP (2009) Kinetics of substrate oxidation and hydrogen peroxide production by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Large Colony (LC) type and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Res Vet Sci* **87**: 364-366.

- Shaw BM**, Daubenspeck JM, Simmons WL & Dybvig K (2013) EPS-I polysaccharide protects *Mycoplasma pulmonis* from phagocytosis. *FEMS Microbiol Lett* **338**: 155-160.
- Shifrine M & Gourlay RN** (1965a) Serological relationship between galactans from normal bovine lung and from *Mycoplasma mycoides*. *Nature* **208**: 498-499.
- Shifrine M & Gourlay RN** (1965b) The immediate type allergic skin reaction in contagious bovine pleuropneumonia. *Journal of Comparative Pathology* **75**: 381-385.
- Shimizu T**, Takaya N & Nakamura A (2012) An L-glucose catabolic pathway in *Paracoccus* species 43P. *J Biol Chem* **287**: 40448-40456.
- Simmons GC & Johnston LAY** (1963) Arthritis in calves caused by *Mycoplasmas* sp. *Australian Veterinary Journal* **39**: 11-14.
- Simmons WL & Dybvig K** (2009) *Mycoplasma* biofilms ex vivo and in vivo. *FEMS Microbiol Lett* **295**: 77-81.
- Singh S**, Phillips Jr GN & Thorson JS (2012) The structural biology of enzymes involved in natural product glycosylation. *Natural Product Reports* **29**: 1201-1237.
- Sirand-Pugnet P**, Citti C, Barre A & Blanchard A (2007b) Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Research in Microbiology* **158**: 754-766.
- Sirand-Pugnet P**, Lartigue C, Marenda M, *et al.* (2007a) Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. *PLoS Genet* **3**: e75.
- Smith PF** (1984) Lipoglycans from mycoplasmas. *Crit Rev Microbiol* **11**: 157-186.
- Snapper CM** (2012) Mechanisms underlying in vivo polysaccharide-specific immunoglobulin responses to intact extracellular bacteria. *Ann N Y Acad Sci* **1253**: 92-101.
- Srivastava NC**, Thiaucourt F, Singh VP & Sunder J (2000) Isolation of *Mycoplasma mycoides* small colony type from contagious caprine pleuropneumonia in India. *Vet Rec* **147**: 520-521.
- Sutherland IW** (1972) Bacterial Exopolysaccharides. *Adv Microb Physiol*, Vol. Volume 8 (Rose AH & Tempest DW, ed.[^]eds.), p.[^]pp. 143-213. Academic Press.
- Tajima M**, Yagihashi T & Miki Y (1982) Capsular material of *Mycoplasma gallisepticum* and its possible relevance to the pathogenic process. *Infect Immun* **36**: 830-833.
- Tamura K**, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739.
- Tardy F**, Maigre L, Poumarat F & Citti C (2009) Identification and distribution of genetic markers in three closely related taxa of the *Mycoplasma mycoides* cluster: refining the relative position and boundaries of the *Mycoplasma* sp. bovine group 7 taxon (*Mycoplasma leachii*). *Microbiology* **155**: 3775-3787.
- Tardy F**, Baranowski E, Nouvel LX, *et al.* (2012) Emergence of Atypical *Mycoplasma agalactiae* Strains Harboring a New Prophage and Associated with an Alpine Wild Ungulate Mortality Episode. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 4659-4668.

Theiss P & Wise KS (1997) Localized frameshift mutation generates selective, high-frequency phase variation of a surface lipoprotein encoded by a mycoplasma ABC transporter operon. *J Bacteriol* **179**: 4013-4022.

Thiaucourt F & **Bolske G** (1996) Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmoses of sheep and goats. *Rev Sci Tech* **15**: 1397-1414.

Thiaucourt F, Lorenzon S, David A & Breard A (2000) Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrane protein gene. *Vet Microbiol* **72**: 251-268.

Thiaucourt F, Bolske G, Libeau G, Le Goff C & Lefevre PC (1994) The use of monoclonal antibodies in the diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). *Vet Microbiol* **41**: 191-203.

Thiaucourt F, Manso-Silvan L, Woubit S, *et al.* (2011) *Mycoplasma mycoides*, from “*mycoides* Small Colony” to “*capri*”. A microevolutionary perspective. *BMCgenomics* **12**: 114.

Thomas P (1873) Rapport médical sur le Bou-Frida. *Publication du gouvernement général civil de L'Algérie, Algiers* 1-35.

Tully JG, Barile MF, Edward DG, Theodore TS & Erno H (1974) Characterization of some caprine mycoplasmas, with proposals for new species, *Mycoplasma capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens*. *J Gen Microbiol* **85**: 102-120.

Uilenberg G, Thiaucourt F & Jongejan F (2004) On molecular taxonomy: what is in a name? *Exp Appl Acarol* **32**: 301-312.

Uilenberg G, Thiaucourt F & Jongejan F (2006) *Mycoplasma* and Eperythrozoon (Mycoplasmataceae). Comments on a recent paper. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 13-14.

Van Tieghem P (1878) On sugar mill gum. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* **7**: 180-203.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K & Swings J (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* **60**: 407-438.

Vilei EM, Abdo EM, Nicolet J, Botelho A, Goncalves R & Frey J (2000) Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiology* **146** (Pt 2): 477-486.

Villemot JMP, A.; Queval, R. (1962) Endotoxin from *Mycoplasma mycoides*. *Nature* **193**: 906-907.

Walker CB, Stolyar S, Chivian D, *et al.* (2009) Contribution of mobile genetic elements to *Desulfovibrio vulgaris* genome plasticity. *Environ Microbiol* **11**: 2244-2252.

Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, *et al.* (1989) A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J Bacteriol* **171**: 6455-6467.

Weissborn AC, Rumley MK & Kennedy EP (1992) Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants blocked in production of membrane-derived oligosaccharides. *J Bacteriol* **174**: 4856-4859.

- Westberg J**, Persson A, Holmberg A, *et al.* (2004) The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res* **14**: 221-227.
- White G** (1958) Agar double diffusion precipitation reaction applied to the study of *Asterococcus mycoides*. *Nature* **181**: 278-279.
- Whitfield C** (1988) Bacterial extracellular polysaccharides. *Can J Microbiol* **34**: 415-420.
- Whitfield C** (2006) Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* **75**: 39-68.
- Whitfield C & Valvano MA** (1993) Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Adv Microb Physiol* **35**: 135-246.
- Whitney JC & Howell PL** (2013) Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology* **21**: 63-72.
- Wilkinson J** (1958) The extracellular polysaccharides of bacteria. *Bacteriol Rev* **22**: 46.
- Wise KS**, Foecking MF, Roske K, Lee YJ, Lee YM, Madan A & Calcutt MJ (2006) Distinctive repertoire of contingency genes conferring mutation- based phase variation and combinatorial expression of surface lipoproteins in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* of the *Mycoplasma mycoides* phylogenetic cluster. *J Bacteriol* **188**: 4926-4941.
- Woese CR** (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-271.
- Woese CR**, Stackebrandt E & Ludwig W (1984) What are mycoplasmas: the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. *J Mol Evol* **21**: 305-316.
- Wolcott R**, Costerton JW, Raoult D & Cutler SJ (2013) The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect* **19**: 107-112.
- Woubit S**, Lorenzon S, Peyraud A, Manso-Silvan L & Thiaucourt F (2004) A specific PCR for the identification of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, the causative agent of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). *Vet Microbiol* **104**: 125-132.
- Xue Z**, Hessler CM, Panmanee W, Hassett DJ & Seo Y (2013) *Pseudomonas aeruginosa* inactivation mechanism is affected by capsular extracellular polymeric substances reactivity with chlorine and monochloramine. *FEMS Microbiol Ecol* **83**: 101-111.
- Yu Z**, Wang T, Sun H, *et al.* (2013) Contagious Caprine Pleuropneumonia in Endangered Tibetan Antelope, China, 2012. *Emerging infectious diseases* **19**: 2051.
- Yus E**, Guell M, Vivancos AP, *et al.* (2012) Transcription start site associated RNAs in bacteria. *Mol Syst Biol* **8**.
- Yus E**, Maier T, Michalodimitrakis K, *et al.* (2009) Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. *Science* **326**: 1263-1268.